

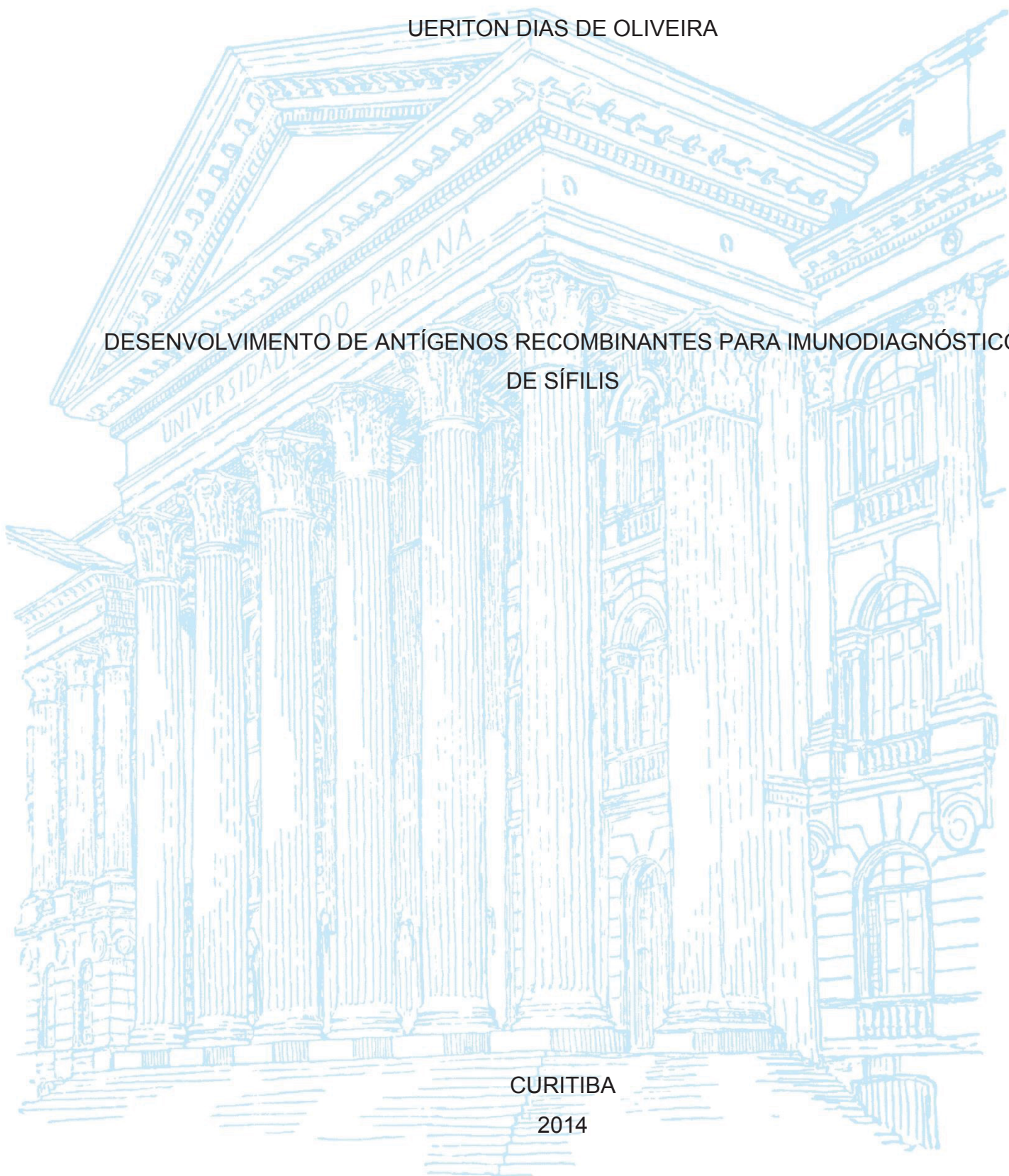
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

UERITON DIAS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA IMUNODIAGNÓSTICO
DE SÍFILIS

CURITIBA

2014



UERITON DIAS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA IMUNODIAGNÓSTICO
DE SÍFILIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Oliveira, Ueriton Dias de

Desenvolvimento de antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de sífilis. / Ueriton Dias de Oliveira. – Curitiba, 2014. 102 p.: il.

Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin

Coorientador: Marco Aurélio Krieger

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Imunodiagnóstico 2. Sífilis 3. Antígenos 4. Proteínas I. Título II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin III. Krieger, Marco Aurélio IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de PósGraduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.292

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas


Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir o mestrando **Ueriton Dias de Oliveira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Desenvolvimento de antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de sífilis", são de parecer favorável à A. PROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 30 de Outubro de 2014



CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA-PR

À memória de minha mãe Esmenia Dias de Oliveira, que dedicou sua vida aos filhos e sempre foi um exemplo de perseverança, enfrentando todas as dificuldades com muito trabalho, dignidade e fé. Uma mulher que apesar de não ter tido oportunidade de estudar e nem ao menos ser alfabetizada, sempre demonstrou imensa sabedoria e nunca mediu esforços para possibilitar minha formação, demonstrando a todo instante seu amor incondicional, minha eterna saudade e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, por me aceitar como aluno e pela paciência e dedicação em me ensinar e estimular meu crescimento profissional.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger meu co-orientador, por me acolher na equipe de desenvolvimento de antígenos e me apresentar ao meu orientador.

À Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, por toda paciência, dedicação e ensinamentos adquiridos neste trabalho.

À Dra. Paola Alejandra Fiorani Celedon, que me acolheu na chegada ao grupo e tanto me ensinou.

Ao Marco Antonio da Silva que sempre me incentivou no trabalho e estudos, sempre prestativo e um grande companheiro.

À Amanda Letois e Dr. Leonardo Foti, pelos ensinamentos, cooperação, agilidade e paciência durante os experimentos de imunoensaios.

Aos colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas: Danilo, Elisa, Fernanda, Kelly, Nayara, Lucianna, Siliane, Priscila, Andrey, Ana Valeria, Stephanie, Aline e Erika, pela constante cooperação e apoio. Em especial ao amigo Claudemir pelas boas conversas e disposição em ajudar.

A todos os colegas do Laboratório de Genômica do Instituto Carlos Chagas em especial as amigas Adriana, Cyndia Mara, Elizabeth e Juliana pela companhia e bons momentos.

Aos colegas com os quais tive um breve contato, mas que proporcionaram uma rica troca de conhecimento: Izabelle, Ana Cristina, Andreia, Daniele, Willian e Erik.

Ao departamento de Biologia celular e molecular da UFPR que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná e Instituto Carlos Chagas pelo apoio e estrutura fornecidos para realização deste trabalho.

Aos avaliadores Dra. Olga Meiri Chaim e Dr. Emanuel Maltemp pelo acompanhamento e valiosas contribuições.

“Pode-se comparar a expressão e purificação de uma proteína com uma viagem em um bote sobre a correnteza. Se tudo correr bem, você chega ao destino final em tempo. Entretanto, encobertas pela água há milhares de pedras, que ao colidir com o bote, podem causar danos ou mesmo afundá-lo”.

(David Drechsel, Arie Geerlof, Ario de Marco, Gunter Stier, Stephen Weeks, and Hans van der Zandt, Protein expression and Purification Core Facility, 2005).

RESUMO

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível (DST), causada pela bactéria *Treponema pallidum*, que acomete milhões de indivíduos no mundo. A sífilis pode também ser transmitida através de transfusão sanguínea, de forma que a rede de hemocentros necessita testar todas as bolsas de sangue. No Brasil, só no ano de 2003 dados epidemiológicos do ministério da saúde indicam 843300 casos. É particularmente preocupante a prevalência de sífilis em gestantes, que pode ocasionar danos à saúde da mãe e criança. Considerando os testes realizados para controle de qualidade do sangue e de monitoramento da saúde materno-infantil, o número de testes realizados para diagnóstico de sífilis é de vários milhões por ano. Estes testes são fornecidos, em geral, por indústrias internacionais. O diagnóstico laboratorial da sífilis é realizado principalmente por testes sorológicos. A presença ou ausência de antígenos treponêmicos diferencia estes testes em: 1) não treponêmicos como o “*Nontreponemal Venereal Disease Research Laboratory*” (VDRL) para triagem e avaliação da resposta aos tratamentos e 2) treponêmicos diretos como ensaio de hemaglutinação (TPHA), imunofluorescência indireta (FTA-ABS) e ensaios de imunoadsorção com enzima conjugada denominada pela sigla em inglês de ELISA. A detecção direta de anticorpos anti-treponêmicos depende da utilização de antígenos de *Treponema* e alguns antígenos recombinantes vêm sendo testados como imunoreagentes para diagnóstico. Proteínas treponêmicas clonadas e expressadas em *Escherichia coli*, apresentam bom desempenho em imunoenaios. Para este trabalho foram selecionadas as proteínas denominadas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 visando determinar o conjunto mínimo de antígenos treponêmicos para imunodiagnóstico de sífilis. Estas proteínas foram expressas em *E. coli*, purificadas e avaliadas seu uso em imunodiagnóstico. Os testes imunológicos foram realizados em sistema Luminex 200 utilizando painéis sorológicos validados analisados em três conjuntos de testes. A proteína TpN17 apresentou em média 100% de sensibilidade e 99,16% de especificidade com as amostras testadas. A proteína TpN47 apresentou em média 100% de sensibilidade e 98,40% de especificidade para as amostras testadas. A proteína TmpA apresentou em média 84,33% de sensibilidade e 93,03% de especificidade testada com os conjuntos de amostras. E a proteína TpN15 apresentou 97,33% de sensibilidade e 93% de especificidade em média testada com os conjuntos de amostras. Além da caracterização imunológica, as proteínas TpN17, TpN47, TpN15 e TmpA foram submetidas a caracterização biofísica visando analisar sua estabilidade, solubilidade e estado de agregação. As análises de CD (Dicroísmo Circular) indicam que as proteínas TpN17, TpN47, TpN15 e TmpA, são estruturadas e são termicamente estáveis até temperaturas próximas de 35°C. As análises de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) demonstraram que as proteínas TpN17, TpN47, TpN15 e TmpA não apresentam agregados tendo a qualidade necessária para imunoenaios.

Palavras-chave: *Imunodiagnóstico; sífilis; antígenos recombinantes; caracterização biofísica de proteínas.*

ABSTRACT

Syphilis is a sexually transmitted disease (STD) caused by the bacterium *Treponema pallidum*, which affects millions of individuals worldwide. Syphilis can also be transmitted through blood transfusion, so that the network of blood centers need to test all blood bags. In Brazil, only in 2003 epidemiological data from the health ministry show 843 300 cases. Of particular concern is the prevalence of syphilis in pregnant women, which can cause damage to the health of mother and child. Considering the tests for quality control of blood and monitoring of maternal and child health, the number of tests for syphilis is several million per year. These tests are provided in general by international industry. The laboratory diagnosis of syphilis is performed mainly by serological tests. The presence or absence of treponemal antigens differentiates these tests: 1) nontreponemal as "Nontreponemal Venereal Disease Research Laboratory" (VDRL) for screening and assessment of response to treatment and 2) as direct treponemal hemagglutination assay (TPHA), immunofluorescence indirect (FTA-ABS) tests and enzyme-linked immunosorbent assay coupled called by the acronym ELISA. The direct detection of anti-treponemal antibodies depends on the use of antigens of *Treponema* and some recombinant antigens have been tested as immune reagents for diagnosis. Treponemic proteins cloned and expressed in *Escherichia coli*, have good performance in immunoassays. For this work we selected the proteins called TpN17, TpN47, TpN15 and TmpA to determine the minimum set of treponemal antigens for immunodiagnosis of syphilis. These proteins were expressed in *E. coli*, purified, and evaluated their use in immunodiagnosis. Immunological tests were performed on the Luminex 200 system using validated serological panels analyzed into three sets of tests. The TpN17 protein showed an average 100% sensitivity and 99.16% specificity with the tested samples. The TpN47 protein showed an average 100% sensitivity and 98.40% specificity for the tested samples. The TmpA protein showed an average 84.33% sensitivity and 93.03% specificity tested with sets of samples. And TpN15 protein showed 97.33% sensitivity and 93% specificity on average tested with sets of samples. Besides the immunological characterization, the TpN17, TpN47, TpN15 and TmpA proteins were subjected to biophysical characterization in order to analyze its stability, solubility and physical state. Analyses of CD (Circular Dichroism) indicate that TpN17, TpN47, TpN15 and TmpA proteins, are structured and are thermally stable up to temperatures close to 35 °C. The analyzes of DLS (Dynamic Light Scattering) showed that TpN17, TpN47, TpN15 and TmpA proteins not present aggregates having the quality required for immunoassays.

Keywords: Immunodiagnostic; syphilis; recombinant antigens; Biophysical characterization of proteins

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO	31
FIGURA 2: ESQUEMA ENSAIO POR MICROARRANJO LÍQUIDO LUMINEX.....	39
FIGURA 3: ESQUEMA, SISTEMA DE LEITURA DE MICROESFERAS POR LUMINEX	40
FIGURA 4: GRÁFICO DE CURVA ROC	42
FIGURA 5: ANÁLISE DOS CLONES POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	45
FIGURA 6: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN17.....	46
FIGURA 7: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE PROTEÍNA TPN17	46
FIGURA 8: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA TPN17	47
FIGURA 9: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN 17	48
FIGURA 10: AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPN17	49
FIGURA 11: ANÁLISE DE ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA TPN17	50
FIGURA 12: ANÁLISE ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TPN17.....	51
FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN17	52
FIGURA 14: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO I	53
FIGURA 15: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO II	54
FIGURA 16: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO III	55
FIGURA 17: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN47.....	56
FIGURA 18: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN47	56
FIGURA 19: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN47	57
FIGURA 20: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN47	58
FIGURA 21: ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPN47	59
FIGURA 22: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN47	60
FIGURA 23: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO I	61
FIGURA 24: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO II	62
FIGURA 25: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM APROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO III	63
FIGURA 26: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TMPA	64
FIGURA 27: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TMPA.....	64
FIGURA 28: ANÁLISE DO CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TMPA	65
FIGURA 29: AVALIAÇÃO DA CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TMPA.....	66
FIGURA 30: ANÁLISE DE CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TMPA	67
FIGURA 31: ANÁLISE POR DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA TMPA.....	67

FIGURA 32: AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO I	68
FIGURA 33: AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO II	69
FIGURA 34: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO III	70
FIGURA 35: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN15	71
FIGURA 36: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN15	71
FIGURA 37: ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TPN15	73
FIGURA 38: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN15	74
FIGURA 39: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO I	75
FIGURA 40: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO II	76
FIGURA 41: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO III	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANTÍGENOS DE <i>TREPONEMA PALLIDUM</i> SELECIONADOS PARA ESTE TRABALHO.	33
TABELA 2: MÉDIA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES TESTADOS COM AMOSTRAS DOS PAINÉIS SOROLÓGICOS DOS GRUPOS I E II.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-: negativo

+: positivo

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

6xHis: cauda com 6 histidinas

A600: absorvância a 600 nm

AEQ: Agente Externo de Qualidade

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

bp: base pairs (pares de base)

C: carboxi

CD: Circular Dicroism (Dicroísmo circular)

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos)

CV: Volumes de Coluna

DLS: Dynamic light scattering (Espalhamento dinâmico de Luz)

DNA: *deoxyribo nucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DST: Doença sexualmente transmissível

E. coli: Escherichia coli

EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético

EIA: Ensaio imunoenzimático

ELISA: *Enzyme linked Immunosorbent assay*

EUA: Estados Unidos da América

FTA-ABS: Teste de imunofluorescência indireta para a determinação de anticorpos contra o *Treponema pallidum*

g: grama

h: hora

HCl: cloreto de hidrogênio

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HSH: Homens que fazem sexo com homens

IFA: teste de imunofluorescência

HTLV: Human T lymphotropic virus (vírus T-linfotrófico humano).

IgG: imunoglobulina G

IPTG: isopropil1 β -tiogalactopiranisídeo

kDA: kilodalton

L: litro

LATED: Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (BioManguinhos-Rio de Janeiro)

LB: Luria-Bertani

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

MIF: Média de Imunofluorescência

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

MPa: Mega Pascal

N: amino

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: nanograma

nm: nanômetro

ORFs: Open reading frames

PBS: tampão fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial hidrogeniônico

pI: potencial iônico

PMSF: *phenyl methane sulphonyl fluoride*

Psi: pound force per square inch (pressão: libra força por polegada quadrada)

RDC: Resolução da diretoria colegiada.

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

ROC: Receiver Operating Characteristic

rpm: rotações por minuto

SDS: Sódio dodecil-sulfato

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

seg: segundo

SINAN: Sistema de informações de agravos de notificações

TCB: tampão carbonato-bicarbonato

TM: transmembrana

TmpA: Proteína de membrana de *Treponema pallidum* de 44,5 kDa

TPHA- *Treponema pallidum* hemagglutination

TpN15: Proteína de membrana de *Treponema pallidum* de 15 kDa

TpN17: Proteína de membrana de *Treponema pallidum* de 17 kDa

TpN47: Proteína de membrana de *Treponema pallidum* de 47 kDa

Tris: tri (hydroxymethyl) amino methane

U: unidade

V: volts

VDRL: Veneral Disease Research Laboratory

WB: *Western Blotting*

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

x g: RCF (força centrífuga relativa)

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Relevância da Sífilis	19
2.2 Patógeno <i>Treponema pallidum</i>	23
2.3 Diagnóstico Laboratorial da Sífilis.....	24
2.4 Proteínas de <i>T. pallidum</i> Seleccionadas neste Estudo	26
2.5 Ensaio Baseado em Microesferas e Microarranjo Líquido	27
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GERAL:.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Sistema de expressão para os Antígenos Recombinantes	31
5.2 Seleção de antígenos	32
5.3 Obtenção e subclonagem da sequência codificadora das Proteínas Antigênicas	32
5.4 Transformação de Bactérias <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Star por Choque Térmico	34
5.5 Expressão das Proteínas Recombinantes	34
5.6 Preparação dos Extratos Celulares	35
5.7 Purificação das Proteínas Recombinantes	35
5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	36
5.9 Caracterização Estrutural das Proteínas Recombinantes	37
5.9.1 Dicroísmo Circular (CD)	37
5.9.2 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	37
5.9.3 Modelagem de Proteínas Recombinantes para Análise Estrutural	38
5.10 Ensaio Sorológicos	39
5.10.1 Amostras Sorológicas Analisadas	42
5.10.2 Ensaio de Acoplamento dos Antígenos às Microesferas	43
6. RESULTADOS	45

6.1	Subclonagem em Vetor de Expressão das Proteínas Recombinantes TpN17, TpN47, TmpA e TpN15.....	45
6.2	Purificação e Caracterização da Lipoproteína de Membrana TpN17	46
6.3	Caracterização da Proteína TpN17.....	48
6.4	Testes Sorológicos com a Proteína TpN17.....	52
6.5	Purificação da Lipoproteína de Membrana TpN47	55
6.6	Caracterização Estrutural da Proteína TpN47.....	58
6.7	Testes Sorológicos com a Proteína TpN47.....	60
6.8	Purificação e Caracterização da Lipoproteína de Membrana TmpA	63
6.9	Caracterização Estrutural da Proteína TmpA.....	66
6.10	Testes Sorológicos para a Proteína TmpA	68
6.11	Purificação da Lipoproteína de Membrana TpN15.....	70
6.12	Caracterização Estrutural da Proteína TpN15.....	72
6.13	Testes Sorológicos para a Proteína TpN15	74
7.	DISCUSSÃO	78
7.1	Potencial dos Antígenos Recombinantes para Diagnóstico de Sífilis.....	78
7.2	Vantagens do Sistema de Expressão de Proteínas Recombinantes em <i>E. coli</i>	79
7.3	Vantagens em se Usar Genes Sintéticos.....	80
7.4	Métodos de Purificação Adotados	81
7.5	Caracterização Estrutural	82
7.6	Desempenho dos Antígenos nos Testes Sorológicos	87
8.	CONCLUSÃO.....	92
9.	BIBLIOGRAFIA.....	93

1. INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pelo *Treponema pallidum* (*T. pallidum*). A diversidade de manifestações clínicas desta doença dificulta seu diagnóstico, tendo a análise sorológica papel fundamental no diagnóstico preciso da sífilis. Apesar de sua importância, as técnicas de análise tradicionais possuem grandes limitações (BINNICKER, YAO, & COCKERILL, 2011) sendo fundamental para a efetiva prevenção e controle da sífilis o desenvolvimento de novas técnicas de análise que apresentem maior sensibilidade e especificidade.

Os principais testes comerciais disponíveis usados para a triagem e diagnóstico da sífilis são: *Treponema pallidum* hemaglutinação (TPHA), imunofluorescência indireta (FTA-ABS), e ensaio imunoenzimático (EIA) como confirmatório treponêmico. Além disso, a técnica de Western blotting (WB) também é empregada usando lisado de células inteiras de *Treponema pallidum* (BYRNE et al., 1992), como um ensaio alternativo para FTA-ABS ou TPHA-TP (BYRNE et al., 1992; HENSEL, WELLENSIEK, & BHAKDI, 1985).

A tecnologia de DNA recombinante e os avanços nas técnicas de clonagem permitem a produção e caracterização de proteínas específicas em quantidades ilimitadas, fornecendo uma fonte de antígeno confiável e consistente. Essas técnicas são particularmente atraentes para microrganismos não cultiváveis como *T. pallidum* (sato et al., 1999). De forma que, a capacidade de usar o antígeno recombinante específico irá melhorar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes sorológicos para sífilis.

Proteínas de membrana externa de *T. pallidum* são os principais alvos de adesão ao hospedeiro e a resposta imune. Por isso, estudos têm-se centrado sobre os mecanismos patogênicos da *T. pallidum* e sua resposta imune do hospedeiro. Sendo nove proteínas de *T. pallidum*: Tp15, Tp17, Tp33, Tp37, Tp39, Tp43, Tp45, Tp47, e Tp97 as mais imunogênicas (SAMBRI et al., 2001). Destes, quatro lipoproteínas de membrana externa Tp15, Tp17, Tp44,5 (TnpA) e Tp47 são constantes entre os resultados de diferentes metodologias (AKINS, PURCELL, MITRA, NORGARD, & RADOLF, 1993; PURCELL et al., 1989; WEIGEL, BRANDT, & NORGARD, 1992) e possuem forte imunogenicidade, portanto, consideradas alvos importantes para o diagnóstico sorológico da sífilis.

Com o sequenciamento completo do genoma de *T. pallidum* foi possível à clonagem de dos principais antígenos. Assim, um grande número de proteínas de *T. pallidum* foi produzida de forma recombinante e demonstrou ser valioso para o diagnóstico de sífilis. Vários ensaios sorológicos foram desenvolvidos com base na utilização destas proteínas

recombinantes individualmente ou em combinação e encontrado excelente sensibilidade e especificidade (SUN, FAN, SHEN, TANG, & YAN, 2009).

O presente estudo buscou a caracterização estrutural das proteínas recombinantes TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA pelos métodos de Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) e Dicroísmo Circular (CD) e bem como o potencial para imunodiagnóstico destes antígenos pelo método de microarranjo líquido no sistema LUMINEX 200 em reações individuais e combinações entre os antígenos de *T. pallidum* e antígenos de outras doenças infecciosas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relevância da Sífilis

A sífilis é uma doença infecciosa sistêmica de evolução crônica, causada pela bactéria espiroqueta *Treponema pallidum*. A infecção pode ser adquirida (por contato sexual, transfusão sanguínea) ou congênita (por transmissão vertical) e sua evolução apresenta períodos distintos de manifestação clínica bem definidos(AVELLEIRA & BOTTINO, 2006).

A doença se desenvolve em múltiplos estágios e apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas, acometendo praticamente todos os órgãos do hospedeiro. No caso da transmissão sexual, a infecção se dá quando o treponema, presente em lesões na região genital de um indivíduo, infecta outro através das mucosas e pequenas abrasões dérmicas decorrentes da relação sexual (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006). O treponema difunde-se pelo organismo hospedeiro por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos (RADOLF & LUKEHART, 2006). O estágio primário da sífilis se manifesta nas três semanas seguintes e é caracterizada pelo aparecimento de pequenas lesões endurecidas (cancros) no local da inoculação e pelo crescimento anormal de linfonodos nas regiões próximas a lesão(LAFOND & LUKEHART, 2006).

Na sífilis secundária que ocorre cerca de três meses após a infecção e seus sintomas são decorrentes da disseminação sistêmica. Surgem lesões pálidas na região torácica, e erupções avermelhadas nas palmas das mãos e planta dos pés. Podem também surgir lesões necróticas (DON, RUBINSTEIN, & CHRISTIE, 1995), verrugas infecciosas na região genital e linfadenopatia generalizada (HIRA, PATEL, BHAT, CHILIKIMA, & MOONEY, 1987), além de complicações renais, gástricas e hepáticas (MULLICK et al., 2004). Mesmo sem tratamento, esse estágio geralmente cessa em cerca de três meses, mas a infecção permanece por tempo indeterminado. Podem ocorrer manifestações secundárias recorrentes e complicações neurológicas que caracterizam um quadro clínico denominado neurosífilis, associado a dores de cabeça, náuseas, vômitos, rigidez na nuca, perda de audição e distúrbios visuais, entre outros sintomas (HOOK & MARRA, 1992).

Com o tratamento através do antibiótico penicilina, manifestações tardias da sífilis são raras, mas parte dos infectados latentes podem vir a desenvolver o estágio terciário da doença. Os sintomas aparecem de 20 a 40 anos após a contaminação e incluem inflamações progressivas que causam “gomias”, lesões nodulares e granulomatosas com necrose central que acometem pele e ossos. O óbito relacionado à sífilis decorre principalmente de

complicações cardiovasculares e aneurisma características de sífilis cardiovascular (LAFOND & LUKEHART, 2006).

A sífilis corretamente diagnosticada e acompanhada visa prevenir um número maior de casos da doença congênita. Embora haja relatos que destacam a maior prevalência de sífilis (70% maior) em regiões pobres e de menor acesso à saúde. Acrescentar exames sorológicos de sífilis na rotina pré-natal representa importante fator de controle e identificação de gestantes e crianças submetidas à sífilis, permitindo o correto diagnóstico e tratamento ainda durante a gestação.(HOLLIER & COX, 1998; TEMMERMAN *et al.*, 2000).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorrem 12 milhões de novos casos de sífilis em adultos no mundo ao ano(WHO, 2008).Considerada uma doença sexualmente transmissível (DST), a sífilis vem desafiando os serviços de saúde pública ao longo de décadas. (SINGH & ROMANOWSKI, 1999). Apesar do agente etiológico, o *Treponema pallidum* ser conhecido há muito tempo o seu diagnóstico mantém-se controverso e laborioso baseando-se em critérios não bem fundamentados (WALKER & WALKER, 2002).

Ressurgindo como uma ameaça à saúde pública mesmo em países desenvolvidos como nos Estados Unidos a prevalência de sífilis vem aumentando. O Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) alertou para o aumento de 2,1 casos para 100 mil habitantes no ano 2000 para 5,1 casos para cada 100 mil habitantes no ano de 2013. Com os maiores aumentos ocorrendo entre homens que fazem sexo com homens (HSH). Entre as mulheres, as taxas aumentaram durante 2005-2008 e diminuíram durante 2009-2013, com tendências diferentes entre os diferentes grupos étnicos raciais. Disparidades sociais, étnicas e raciais relatados na sífilis persistiram durante 2005-2013, provavelmente refletindo determinantes sociais da saúde, tais como status socioeconômico, que possam contribuir para o fardo da sífilis em uma comunidade (CDC, 2012).

Além dos fatores clínicos (primários, secundários e neurosífilis ou cardiosífilis), a infecção treponêmica apresenta um fator agravante que se refere ao contexto obstétrico e da transmissão vertical da doença (DUARTE, 2004). A sífilis durante a gestação na maioria dos casos provoca aborto espontâneo, nascimento prematuro, morte fetal, morte ao nascimento, além de complicações sintomáticas relativas à doença em recém-nascidos contaminados. Entretanto, alterações patológicas relacionadas à sífilis nem sempre são observadas na gestante. (WICHER, HOROWITZ, & WICHER, 1999).A criança também pode ser contaminada durante o parto, pelo contato com lesões genitais maternas. Manifestações tardias, a partir dos dois anos de vida, incluem malformações ósseas, surdez, deficiência mental, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e anemia (SILVA, 2009).

Em 2001, a Organização Mundial da Saúde (WHO) alertou para o índice de um milhão de gestantes infectadas pela sífilis, sendo aproximadamente 270 mil casos de crianças com sífilis congênita, em torno de 470 mil abortos ou mortes perinatais e cerca de 270 mil neonatos prematuros e abaixo do peso (WHO, 2001). Estas estimativas superam outras infecções de transmissão vertical ou neonatal como HIV e Tétano (TEMMERMAN *et al.*, 2000).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado da sífilis nas gestantes são fundamentais para a prevenção da sífilis congênita (BRASIL, 2010). Dados do Ministério da Saúde do Brasil relatam o total de 14.321 casos notificados de sífilis em gestantes em 2011. De 2005 a junho de 2012, foram notificados 57.700 casos, dos quais a maioria ocorreu nas Regiões Sudeste e Nordeste, com 38,0% e 25,7% respectivamente. Dentre os casos notificados no Brasil em 2011, 45,3% ocorreram na Região Sudeste, 23,5% na Região Nordeste, 11,8% na Região Norte, 10,2% na Região Sul e 9,3% na Região Centro-Oeste. A proporção média nacional chegou a 5,0 casos por 1.000 nascidos vivos (5,0/1000) e, ainda é superada nas Regiões Centro-Oeste 6,0/1000, Sudeste 5,8/1000 e Norte 5,5/1000. Quanto aos estados, as taxas mais elevadas observam-se no Mato Grosso do Sul 13,7/1000 e Rio de Janeiro 10,8/1000 (BRASIL, 2012).

A sífilis congênita é uma doença de fácil prevenção, mediante o acesso precoce à triagem durante o pré-natal e o tratamento adequado das gestantes positivas, incluindo o tratamento do parceiro. A política de prevenção da mortalidade materno-infantil do Pacto pela Saúde do Ministério da Saúde de 2006 inclui metas de redução da transmissão vertical da sífilis (BRASIL, 2012).

Entre 1998 e junho de 2012, foram notificados 80.041 casos de sífilis congênita em menores de um ano de idade. A Região Sudeste registrou 45,9% desses casos; o Nordeste, 31,4%; o Norte, 8,7%; o Sul, 7,7%; e o Centro-Oeste, 6,3% (BRASIL, 2012). Em 2011, foram notificados 9.374 novos casos de sífilis congênita em menores de um ano de idade, dos quais 43,6% ocorreram na Região Sudeste, 34,0% na Região Nordeste, 9,7% na Região Sul, 8,5% na Região Norte, e 4,2% na Região Centro-Oeste. A incidência média de sífilis congênita no Brasil foi de 3,3 casos por 1.000 nascidos vivos (3,3/1000), sendo que as Regiões Nordeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas nesse período, 3,8 e 3,6, respectivamente. Nos estados, o Rio de Janeiro apresentou o maior índice 9,8 por 1.000 nascidos vivos, seguidos por Ceará com 6,8, Sergipe com 6,7, Alagoas com 5,9, Rio Grande do Norte com 5,4 e Pernambuco com 4,9 por 1000 nascidos vivos (BRASIL, 2012).

Entre os anos de 1998 e 2011, o número de óbitos por sífilis congênita, declarados foi de 1.780, sendo 52,0% na Região Sudeste, 28,4% no Nordeste, 8,9% no Sul, 7,6% no Norte e 3,1% no Centro-Oeste. Ainda em relação aos óbitos por sífilis congênita, em 2011 foi declarado um total de 112 óbitos, o que corresponde a um coeficiente de mortalidade de 3,9 por 100.000 nascidos vivos. Nesse aspecto, verificou-se um coeficiente de 4,6 para a Região Nordeste e 4,0 para o Sudeste, 3,9 para o Norte, 3,8 para o Sul e 0,9 para o Centro-Oeste (BRASIL, 2012).

O correto diagnóstico da sífilis é um dos grandes desafios da medicina moderna. O potencial de assumir formas assintomáticas e a capacidade de induzir produção de anticorpos são fatores limitantes na realização do diagnóstico. Estas limitações em geral acarretam em interpretações inadequadas do exame sorológico incorrendo em diagnóstico e terapias ineficazes (SHEFFIELD & WENDEL, 1999).

Testes para sífilis também são exigidos para transfusões de sangue. No Brasil, a Portaria 354/06, reforçada pela Resolução RDC 57/2010, recomendada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou a obrigatoriedade da realização de testes de triagem sorológica nos serviços de hemoterapia para sífilis, doença de Chagas, hepatite B e C, AIDS, HTLV e malária. Atualmente, o diagnóstico de sífilis é realizado através da combinação de testes específicos e não específicos. A maioria dos laboratórios de triagem tem optado pelo *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e o ensaio *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (BRASIL, 2010).

O declínio das taxas de sífilis em doadores de sangue em países desenvolvidos sugere que não seja necessária a utilização de testes sorológicos para triagem. Entretanto nos países em desenvolvimento sorologia reagentes para sífilis podem ser encontradas em até 13,5% dos doadores (SCHMUNIS, ZICKER, CRUZ, & CUCHI, 2001).

Nos Estados Unidos em 1937, a sífilis era a doença “transmissível por sangue” mais frequente, cerca de 500 mil casos relacionados à transfusão sanguínea braço-a-braço (SCHMIDT, 2001). Mas o risco atual de transmissão de sífilis via transfusão sanguínea é quase nulo, em face à seleção dos doadores e à triagem sorológica em todas as amostras (GARDELLA, MARFIN, KAHN, SWINT, & MARKOWITZ, 2002). Entretanto, hipoteticamente a transmissão de sífilis por transfusão sanguínea é possível, tendo em vista que o *Treponema pallidum* sobrevive por até cinco dias em sangue refrigerado (VAN DER SLUIS *et al.*, 1984).

2.2 Patógeno *Treponema pallidum*

A sífilis é causada pela bactéria gram-negativa *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, ou simplesmente *T. pallidum* conforme a classificação taxonômica atual. É um organismo pertencente ao filo Spirochaetae e à família Treponemataceae, que inclui também os gêneros *Leptospirae* *Borrelia*, ambos de grande importância para a saúde humana (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006).

O gênero *Treponema* engloba mais três espécies de relevância médica: *T. endemicum*, agente causador da sífilis endêmica; *T. pertenue*, associado à boubá ou framboesia; e *T. carateum*, patógeno que causa a pinta (SMAJS *et al.*, 2005). Dados sobre a estrutura antigênica, metabolismo e fisiologia de *T. pallidum* estão relatados nos trabalhos realizados por Nichols e feitos em coelhos desde 1912. Trata-se de uma espiroqueta de 0,10 – 0,18 µm de diâmetro e 6–20 µm de comprimento, não apresenta gancho na extremidade corporal como nos demais espiroquetas comensais humanos, possui motilidade permitida pelo endoflagelo (NICHOLS & HOUGH, 1913; NORRIS, 1993; WEIGEL *et al.*, 1992; ZOECHLING, SCHLUEPEN, SOYER, KERL, & VOLKENANDT, 1997).

O *T. pallidum* é bastante adaptado ao parasitismo humano, tem alta infectividade e baixa virulência, longos períodos de latência e persistência em hospedeiros não tratados. Não é conhecida nenhuma enzima destruidora de tecidos produzida por treponema. As lesões características da infecção são associadas à resposta imune do hospedeiro tais como, infiltrado mononuclear celular, proliferação vascular e em alguns casos formação de granulomas (WALKER, BORENSTEIN, BLANCO, MILLER, & LOVETT, 1991). Os mecanismos de patogenicidade são pobremente conhecidos, sendo que os fatores potenciais de virulência incluem uma família de proteínas de membrana e várias possíveis hemolisinas (WALKER, 2001).

T. pallidum não possui membrana celular e é protegido por um envelope externo com três camadas ricas em moléculas de ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-glucosamina. Os flagelos e inicia na extremidade distal da bactéria e encontram-se junto à camada externa ao longo do eixo longitudinal. Move-se por rotação do corpo em volta desses filamentos (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006), mas apresenta baixa antigenicidade devido à ausência de lipopolissacarídeos (LAFOND & LUKEHART, 2006). Já a camada interna é formada por lipoproteínas (YELTON *et al.*, 1991) e proteínas de ligação à penicilina (HOOVER & RADOLF, 2011). Apesar da grande proporção de elementos antigênicos, essa membrana

possui fraca imunogenicidade pelo fato de ser envolvida pela camada externa(CASTRO, 2004). A resposta imunológica do hospedeiro é induzida principalmente pelas proteínas constituintes dos flagelos, que percorrem o microrganismo de uma extremidade a outra(RADOLF & LUKEHART, 2006).

O genoma de *T. pallidum* é formado por um cromossoma circular de 1.138.006 pares de bases contendo 1041 “*open reading frames*” (ORFs)(FRASER *et al.*, 1998). Sessenta e sete destas sequências são genes associados à patogenicidade (CASTRO, 2004), com destaque para os genes *ter*, que codificam proteínas de superfície como porinas e adesinas (GRAY *et al.*, 2006). A quantidade, organização e variabilidade dessas proteínas indica que os mesmos constituem um sistema de variação antigênica capaz de dificultar o reconhecimento do patógeno pelos anticorpos do hospedeiro, sendo caracterizado, portanto, como um mecanismo de evasão imunológica(GRAY *et al.*, 2006).

2.3 Diagnóstico Laboratorial da Sífilis

O diagnóstico de sífilis pode ser realizado por três métodos base; microscopia direta, testes não treponêmicos úteis à triagem e acompanhamento clínico e testes treponêmicos. Os testes laboratoriais podem ser ainda divididos em quatro grupos. A microscopia direta (Teste do Campo Escuro) é eficaz quando a lesão está presente; os testes não treponêmicos, sendo o mais comum o VDRL, utilizado como *screening* e acompanhamento; os testes treponêmicos (TPHA, FTA-abs, ELISA), incluindo o teste confirmatório baseado em *Western blotting* além do teste de PCR que detecta diretamente material genético do treponema (LARSEN, STEINER, & RUDOLPH, 1995).O teste não-treponêmico mais amplamente utilizado é o VDRL, pois além de *screening* ele permite o acompanhamento terapêutico para determinar a se há redução nos títulos ao longo do tempo após o tratamento (EBEL, BACHELART, & ALONSO, 1998).

Em geral, os testes sorológicos detectam anticorpos a partir da 3ª semana de contágio. Nas semanas iniciais da infecção maioria dos indivíduos (cerca de 85%), apresentam reação positiva para os testes não-treponêmicos. Um estudo sobre a sensibilidade dos testes treponêmicos e não-treponêmicos revelou 81,8% de sensibilidade para o FTA-abs e 100% de sensibilidade para *Western blotting*. Na fase secundária o VDRL e demais métodos sorológicos tem sensibilidade equivalente entre 95-100% (SÁEZ-

ALQUÉZAR *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que o método de *Western blotting* foi mais eficiente na diferenciação da reação sorológica falsa e verdadeiramente positiva, usando conjugado anti-IgG humana, superou a sensibilidade do teste FTA-abs (BYRNE *et al.*, 1992). A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é baseada na amplificação do DNA treponêmico. Entretanto nos casos de pouca bacteremia a técnica de PCR apresenta baixos índices de sensibilidade (80%) e especificidade (90%) (SALAZAR *et al.*, 2000).

Estudos com *Western blotting* mostram que são produzidos anticorpos contra mais de 20 antígenos de *Treponema* (YOUNG, MOYES, SEAGAR, & MCMILLAN, 1998). Os anticorpos identificam componentes antigênicos de massas moleculares de 15 kDa (TpN15) e 47 kDa (TpN47) que são importantes no diagnóstico da sífilis adquirida e da sífilis congênita. O número de bandas identificadas na membrana do *Western blot* se correlaciona com a fase clínica da infecção quanto maior a infecciosidade maior o número de bandas (FARSHY, HUNTER, LARSEN, & CERNY, 1984).

O VDRL é um antígeno não treponêmico constituído por cardiolipina, colesterol e lecitina. Os testes não treponêmicos medem anticorpos anti-lipídios, que se formam no hospedeiro em resposta aos lipídios libertados pelas células do hospedeiro danificadas no início da infecção por *T. pallidum* e a materiais semelhantes a lipídios da superfície celular do treponema (MATTHEWS, YANG, & JENKIN, 1979). O diagnóstico usando antígenos não treponêmicos têm historicamente sido descritos também como “Wassermann Reaction”, cujo método também é chamado de Rapid Plasma Reaction (RPR) em que anticorpos não específicos para *Treponema* são denominados “reagin”. O princípio do método é ao mesmo do VDRL em que usa substâncias liberadas das células danificadas pela infecção por *Treponema* (ORTON, LIU, DODD, & WILLIAMS, 2002; PIETRAVALLE *et al.*, 1999).

Os testes não treponêmicos reativos confirmam o diagnóstico na presença de lesões de sífilis iniciais ou tardias. Fornecem indicações na sífilis subclínica latente e são ferramentas eficazes para detecção de casos em investigações epidemiológicas. Estes testes são superiores aos testes treponêmicos para o acompanhamento da resposta à terapêutica. Todavia, os testes com antígenos não treponêmicos não são inteiramente específicos para a sífilis nem têm uma sensibilidade satisfatória em todos os estágios da doença. Sempre que os resultados de um teste com antígeno não treponêmico não forem concordantes com as indicações clínicas, deverá ser executado um teste com antígeno treponêmico, tal como o teste FTA-abs (KLEYN, SCHWEBKE, & HOLMES, 1993).

Entre os métodos imunológicos existentes para o teste treponêmico confirmatório destacam-se o de aglutinação como o *T. pallidum hemagglutination assay* (TPHA) e a análise

de material imunocorado por *Fluorescent Treponemal Antibodies Adsorption* (FTA-abs). Mais recentemente testes de ELISA e a imunocromatografia (teste rápido) para detecção de anticorpos para *T. pallidum* também foram desenvolvidos. Estes ensaios são baseados em lisados com antígenos altamente purificados de *T. pallidum* cultivados *in vitro*. Entretanto, a presença de contaminantes como flagelos e antígenos de *T. pallidum* nativos podem prejudicar sensibilidade e reprodutibilidade dos testes. Para evitar estes problemas, antígenos recombinantes de *T. pallidum* produzidos em *E. coli* vêm sendo testados. A nomenclatura atual definindo polipeptídios de *T. pallidum* foi padronizada em 1985 na reunião “Treponemal Pathogenesis and Immunity” realizada em Los Angeles. Assim, foi estabelecido o prefixo TpN (para *T. pallidum*, cepa Nichols) seguido da Mr (massa molecular relativa baseada nos resultados de SDS-PAGE) e se necessário uma letra para distinguir peptídeos com Mr similares (NORRIS, 1993).

Durante a fase sintomática da sífilis primária, a primeira resposta identificada por *Western blotting* é contra proteína de superfície de *T. pallidum* TpN47 e proteínas de flagelo incluindo TpN37, TpN33 e TpN30 (BYRNE *et al.*, 1992). Conforme a configuração do método de detecção, estas moléculas podem ser empregadas na forma nativa ou recombinante, em diferentes combinações e proporções (SAMBRI *et al.*, 2001).

2.4 Proteínas de *T. pallidum* Seleccionadas neste Estudo

Antígenos recombinantes vêm sendo testados para detectar diretamente anticorpos para proteínas de superfície de *T. pallidum* com grande potencial. Neste projeto selecionamos quatro proteínas de superfície e três proteínas flagelares de *T. pallidum* para testar como antígenos. As razões destas escolhas estão descritas a seguir.

Num estudo da resposta imunológica em sífilis experimental foi observado reatividade muito precoce para os antígenos TpN47 e TpN37 no período de três a seis dias após a infecção, seguida pela produção de anticorpos para proteínas do “core” endoflagelar TpN33 e posteriormente para duas outras lipoproteínas TpN17 e TpN15 (HANFF, BISHOP, MILLER, & LOVETT, 1983).

Alguns trabalhos relatam a importância do antígeno TpN47 como marcador de sífilis ativa, confirmado pela presença de anticorpo da classe IgM em *Western blotting* com amostras de soros de pacientes com sífilis congênita (LEMOS, 2007; LEWIS & YOUNG,

2006). Anticorpos da classe IgG e IgM estão presentes durante a fase primária e secundária. Anticorpo da classe IgM tem sua atividade diminuída durante os estágios tardios da sífilis e após o início do tratamento. Durante a fase sintomática da sífilis primária a primeira resposta identificada por *Western blotting* é contra a proteína de superfície TpN47 e as proteínas de flagelo TpN37, TpN33 e TpN30 (BYRNE *et al.*, 1992).

Os principais alvos de estudos são proteínas altamente imunogênicas como as proteínas do grupo de membrana. Baseado em análises de *Western blotting* as principais proteínas de membrana imunogênicas de *T. pallidum* apresentam massa molecular de 47, 42, 17 e 15 kDa (FARSHY *et al.*, 1984; FUJIMURA *et al.*, 1997; LEFEVRE, BERTRAND, & BAURIAUD, 1990). Algumas destas proteínas vêm sendo amplamente utilizadas para captura de anticorpos nos testes de diagnóstico sorológico da sífilis: TpN15, TpN17, TpN47, TmpA e TpN37. Esta última é um componente estrutural do flagelo, enquanto as demais foram caracterizadas como proteínas de membrana, sendo que TpN15, TpN17 e TpN47 são lipoproteínas (SATO *et al.*, 1999). Amostras de soros de pacientes com sífilis secundária e latente têm anticorpos contra a maioria dos componentes imunogênicos de *T. pallidum*. A reatividade em geral diminui em sífilis latente tardia e sífilis terciária. As imunoglobulinas IgG permanecem reativas o que justifica a positividade dos *testes treponêmicos* por longos períodos quando comparados com *testes não treponêmicos*. Anticorpos para *T. pallidum* podem ser encontrados alguns dias após o início da sífilis primária, atingindo altos títulos quando a sífilis se dissemina, durante o estágio secundário. Esses anticorpos são detectáveis durante todo o período da infecção e monitoram o prognóstico (LUKEHART, BAKER-ZANDER, & HOLMES, 1984).

2.5 Ensaio Baseado em Microesferas e Microarranjo Líquido

A metodologia de microarranjo líquido, inicialmente descrita por inicialmente por (HORAN & WHEELLESS, 1977) tem sido desenvolvida e indicada nos últimos anos como uma inovação recente, conquistando popularidade na área de imunodiagnóstico e pesquisa

básica (MILLER & TANG, 2009). Assim, produtos desenvolvidos com base neste método estão sendo disponibilizados comercialmente.

O sistema Luminex (Austin, Texas, EUA) consiste num arranjo de microesferas de polietileno em suspensão, impregnadas com diferentes tipos e quantidades de fluoróforos, gerando assim, um conjunto de microesferas diferenciadas. Cada microesfera contém analitos específicos acoplados. Os analitos ligam moléculas específicas, como imunoglobulinas no caso dos antígenos, e a estas se liga uma segunda molécula acoplada a um cromóforo que permite a quantificação, neste caso, das imunoglobulinas ligadas aos antígenos. Através de um sistema de microfluídica o sistema Luminex utiliza de lasers para identificação das esferas e quantificação das imunoglobulinas ligadas aos antígenos, de acordo com a intensidade de sinal associado a cada microesfera (DUNBAR & JACOBSON, 2000; SPIRO, LOWE, & BROWN, 2000). A estratégia de diferenciação das microesferas adotada pelo sistema Luminex permite a detecção simultânea de múltiplas amostras com alta velocidade de processamento. Isto resulta em um sistema capaz de analisar até 100 reações diferentes na mesma solução em pouco tempo (DUNBAR & JACOBSON, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

A transmissão vertical da sífilis permanece um grande problema de saúde pública no Brasil. Das várias doenças que podem ser transmitidas durante o ciclo gestacional, a sífilis é a doença que tem as maiores taxas de transmissão. No Brasil, estudos de representatividade nacional estimam uma prevalência em gestantes de 1,6%, em 2004,

representando 50 mil parturientes com sífilis ativa, e uma estimativa de 15 mil crianças nascendo com sífilis congênita naquele ano. Desde 1986 a sífilis congênita é de notificação compulsória, tem sido incluída no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Entretanto, embora a subnotificação tenha sido a regra, entre os anos de 1998 e 2004 foram notificados 24448 casos de sífilis congênita. Em 2003 observou-se um índice de mortalidade de 2,7 para cada 100 mil, em menores de um ano. Demonstrado ainda um insuficiente controle do agravo em todo território nacional. Como elementos fundamentais no enfrentamento da transmissão vertical da sífilis, as ações de diagnóstico e prevenção precisam ser reforçadas, especialmente no pré-natal e parto.

Em 2003, estimou-se 843.300 o número de casos de sífilis no Brasil(AVELLEIRA & BOTTINO, 2006), cujos mecanismos de transmissão podem ser por contato direto com as lesões de sífilis na pele, via transplacentária ou ainda transfusões sanguíneas(SÁEZ-ALQUÉZAR *et al.*, 2008). No Brasil, a Portaria 1376/93, reforçada pela Resolução RDC 343/2002, preconizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou a obrigatoriedade da realização de testes de triagem sorológica nos serviços de hemoterapia para sífilis, doença de Chagas, hepatite B e C, AIDS, HTLV e malária. Atualmente, a pesquisa para sífilis é realizada combinando testes específicos e não específicos, e a maioria laboratórios têm optado pelo *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) por serem de fácil execução, mas os kits de diagnóstico são em grande maioria importados existem altos custos agregados ao sangue: coleta, testes, sorologia, armazenamento e transporte. O índice brasileiro de doadores é de aproximadamente 1,8% da população. Atualmente, no Brasil, são coletadas por ano, em média, 3,5 milhões de bolsas de sangue.

Os testes de controle de qualidade do sangue da Hemorrede brasileira são bancados pelo sistema único de saúde, os quais juntamente com os testes fornecidos para o monitoramento materno infantil resultam num grande número anual de testes para sífilis e um grande custo para sistema único de saúde. Apenas a unidade de BioManguinhos da FIOCRUZ produz 1.800.000 testes rápidos de sífilis por ano (informação pessoal). Assim, a produção nacional de antígenos para sífilis visa reduzir os custos de produção destes testes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- Desenvolver antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de sífilis utilizando técnicas de engenharia de proteínas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

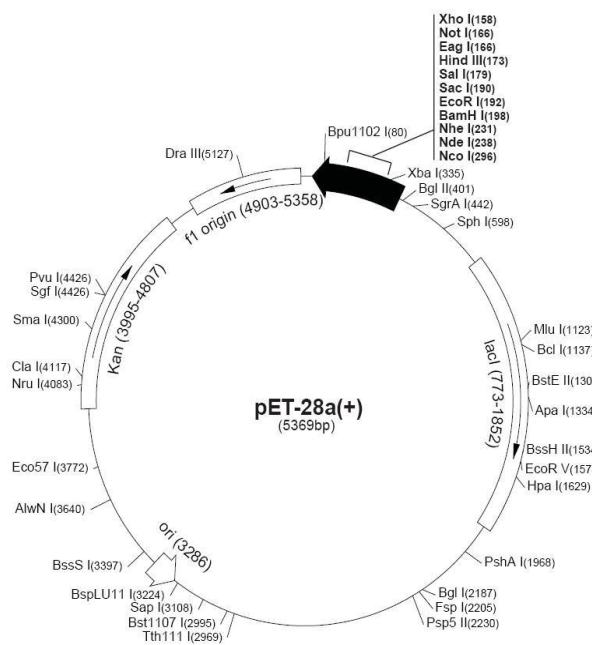
- Identificar um conjunto de antígenos que permitam diagnóstico sorológico com alta sensibilidade e especificidade para *Treponema pallidum*;
- Clonar, expressar, purificar e testar antígenos quanto à sensibilidade e especificidade frente a painéis de soros caracterizados;
- Caracterizar a estabilidade dos antígenos purificados;
- Validar o conjunto de antígenos através da plataforma multiteste destinada à triagem sorológica

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Sistema de expressão para os Antígenos Recombinantes

O plasmídeo para expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* foi pET28a+ (Novagen, figura 1). Os genes de interesse foram clonados sob o promotor da RNA polimerase T7. Os sítios usados foram BamHI e HindIII que resultam na expressão de uma sequência de seis histidinas no N-terminal das proteínas.

FIGURA 1: MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO



Legenda: Vetor de expressão pET28a+ usado na produção dos antígenos recombinantes de *Treponema pallidum*. A seta maior indica a orientação da transcrição e os sítios de restrição onde são inseridas as sequências gênicas de interesse. *f1*, origem de replicação do fago *f1*. *Kan*, gene que confere resistência à canamicina para as bactérias transformadas com este plasmídeo. *ori*, indica a origem de replicação de *E. coli* para este plasmídeo. *LacI*, gene que codifica o repressor para o promotor *lac*.

A cepa de *E. coli* BL21(DE3) -Star (Invitrogen) foi utilizada para expressão das proteínas de *T. pallidum* com o vetor pET28a. Esta cepa contém a RNA polimerase do fago T7 inserido no genoma sob o controle do promotor *lac* que pode ser induzido com IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopyranoside). Após a indução RNA polimerase do T7 vai transcrever o gene do pET28a que está sob o promotor da RNA polimerase de T7. Esta cepa contém

também uma mutação no gene *rne* (*rne131*) que codifica a RNase E. Com isso a cepa perde a capacidade de degradar mRNA resultando num aumento da estabilidade de mRNA.

5.2 Seleção de antígenos

As proteínas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 foram selecionadas para este trabalho porque já vem sendo amplamente utilizadas na captura de anticorpos nos teste diagnósticos (SATO *et al.*, 2004). As sequencias de aminoácidos que compõem estas proteínas foram obtidas do NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/) conforme anotação das sequencias genômicas da cepa *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum* str. Nichols.

5.3 Obtenção e subclonagem da sequência codificadora das Proteínas Antigênicas

As sequencias codificadoras foram adquiridas da empresa GenScript (Piscataway, Nova Jersey, EUA) que produz genes sintéticos a partir de síntese química de DNA. A partir da sequência de aminoácidos do antígeno, foi feita a dedução da sequência nucleotídica, sendo que antes da síntese as sequencias nucleotídicas foram otimizadas para expressão em *Escherichia coli*. Os aspectos genéticos otimizados nos genes sintéticos incluem taxa de utilização de códons (*códon usage*) e redução de: repetições de códons in tandem, estruturas secundárias, elementos de desestabilização do RNA mensageiro (mRNA), distribuição do conteúdo de resíduos G-C (Guanosina-Citosina), repetições de longa amplitude e sequencias codificadoras secundárias. Além disso, aplica-se um filtro para excluir da região interna da sequência codificadora os sítios das enzimas de restrição que serão utilizadas nas etapas de subclonagem nos vetores de expressão. A lista de proteínas antigênicas está apresentada na Tabela 1.

TABELA 1: ANTÍGENOS DE *TREPONEMA PALLIDUM* SELECIONADOS PARA ESTE TRABALHO.

Nome	Código	Tamanho do inserto (pb)	Massa (kDa)
TpN17	IBMP 7-1	429	17
TpN47	IBMP 7-2	993	47
TmpA	IBMP 7-3	1273	38
TpN15	IBMP 7-4	396	15

Fonte: O autor.

A sequência codificadora dos diferentes clones recebidos em pUC57 foram isoladas através de clivagem com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. Após a digestão, os fragmentos foram separados em gel de agarose e purificados com o kit de extração de DNA (Qiagen). O vetor pET28a foi linearizado pela clivagem com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado. A ligação dos fragmentos purificados com o vetor foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*).

O produto da ligação foi transformado em células competentes da cepa DH5 α de *E.coli*, preparadas através do tratamento do cloreto de cálcio. Para identificação dos clones corretos, o DNA plasmideal de diferentes colônias de cada antígeno foi extraído por lise alcalina, clivado com as enzimas de restrição BamHI e HindIII e analisado por eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio (0,5 μ g/L).

Uma das colônias portando o inserto com o tamanho esperado foi utilizada para transformar a cepa de *E. coli* DH5 α cálcio-competente para preparar DNAs estoque dos clones. Para isso, as bactérias cresceram em 100 ml de meio LB (Luria-Bertani) com o antibiótico correspondente a este vetor (canamicina, 50 μ g/mL) a 37°C a 200 rpm por um período de aproximadamente 16 horas (*over night*). Os plasmídeos foram purificados através do kit *Midi Prep Plasmid Purification* (Qiagen). Para confirmar a sequência nucleotídica, o DNA dos mesmos foi analisado por sequenciamento.

5.4 Transformação de Bactérias *E. coli* BL21(DE3) -Star por Choque Térmico

Alíquotas (50µL) de células BL21(DE3) -Star quimiocompetentes (Invitrogen) mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo e a elas foi adicionado de 1 a 5 µL (100 ng) de DNA plasmideal. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos, e então submetidas a choque térmico de 42°C por 2 minutos e recolocadas no gelo por mais 5 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio de cultura SOC (HANAHAN, 1983). As suspensões de células foram mantidas a 37°C sob agitação de 200 rpm por 90 minutos e posteriormente plaqueadas em meio LB suplementado com canamicina (50 µg/mL) de acordo com instruções do fabricante.

5.5 Expressão das Proteínas Recombinantes

Para expressão das proteínas recombinantes, as cepas bacterianas BL21(DE3) -Star transformadas com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 2,5 ml de meio LB com Canamicina (50 µg/mL) mantidos a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Ao fim deste período a cultura foi diluída na proporção 1:20 (volume final 50 mL) em meio LB com Canamicina (50 µg/mL) e mantida nas mesmas condições de crescimento já citadas acima, até a cultura atingir uma densidade óptica entre 0,6 – 0,8 em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). Estes volumes foram adequados aos testes iniciais de expressão das proteínas recombinantes. Para obtenção de volumes apropriados aos ensaios de purificação, caracterização e imunodiagnóstico foram preparados volumes de cultura de 2 litros mantendo as proporções aqui descritas.

Quando a absorbância DO_{600nm} 0,6 – 0,8 da cultura foi atingida, foi adicionado IPTG em uma concentração final de 500 µM, este reagente induz a expressão da proteína de interesse. Para avaliar o efeito da temperatura na expressão solúvel das proteínas de interesse, após a indução por IPTG, a expressão recombinante foi conduzida a 15°C por 16 horas e 25°C e 37°C por 4 horas.

5.6 Preparação dos Extratos Celulares

A preparação dos extratos foi feita através de sonicação ou de microfluidificador. Para preparação dos extratos por sonicação, a cultura bacteriana foi centrifugada a 8000 RPM por 10 minutos a 4°C. O *pellet* de células foi ressuscitado em solução de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% glicerol, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF e inibidora protease Roche usando a proporção 2mL de tampão por grama de células. Após a ressuspensão, foi adicionada lisozima (200 μ g/mL) e a suspensão incubada no gelo por 60 minutos. A lise celular foi realizada em sonicador Cole-Parmer CP505 (6 ciclos em banho de gelo por 15 segundos em amplitude de 30% com intervalos de 1 minuto a cada pulso). Para separação das frações solúvel e insolúvel, o lisado foi centrifugado a 8000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado. O pellet foi resuscitado em Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M de ureia e submetido a sonicação e centrifugação já descritos e o sobrenadante (insolúvel) coletado.

Para os ensaios de padronização da purificação, a lise celular foi por pressão, através do aparelho microfluidificador (Microfluidics, modelo M-110L) (10 ciclos com pressão de 80 psi - Pound force per Square Inch). O extrato foi clarificado por centrifugação (20.000 x g, 40 minutos, 4°C). Para a precipitação de ácidos nucleicos, a amostra foi incubada com sulfato de estreptomicina (1% p/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado, filtrado através de membranas com poro de 45 μ m, e imediatamente submetido a purificação por cromatografia líquida.

5.7 Purificação das Proteínas Recombinantes

A primeira técnica utilizada foi a de cromatografia de afinidade, visto que as proteínas com sequência e poli-histidinas possuem afinidade ao níquel imobilizado na resina das colunas cromatográficas. As colunas foram equilibradas com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 7 mM de β -mercaptoetanol; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol). Os passos para purificação cromatográfica são: equilíbrio da coluna com 1 volume de coluna de tampão A injeção de amostra, lavagem em 2 volumes de coluna, gradiente I de 20 – 50

mM de imidazol e gradiente II de 50 – 500mM de imidazol, com fluxo de 2 mL/min e pressão máxima estabelecida em 0,8 MPa (0,3 MPa da coluna + 0,5 MPa do sistema). As proteínas são coletadas em frações de 5 mL para as proteínas não ligadas, o passo de lavagem e o gradiente I e em frações de 1,5 mL para o gradiente II.

A cromatografia de troca aniônica foi feita usando coluna HiTrap SP HP de 5 mL (GE Healthcare LifeSciences) para a proteína TpN17 e HiTrap Q-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) de troca catiônica para as proteínas TpN47 e TmpA. Os tampões para este método foram: Tampão 2A (20 mM tampão Fosfato pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 7 mM β -mercaptoetanol; 10% glicerol) e tampão 2B (20 mM tampão fosfato pH 7,4; 1 M NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 7 mM β -mercaptoetanol; 10% glicerol). Os passos cromatográficos são: equilíbrio da coluna com 1 volume de coluna de tampão 2A, injeção de amostra, lavagem em 2 volumes de coluna, gradiente de 50 mM a 1 M de NaCl, com fluxo de 2 ml/min e pressão máxima estabelecida em 0,8 MPa (0,3 MPa da coluna + 0,5 MPa do sistema). As proteínas são coletadas em frações de 5 mL para proteínas não ligadas e o passo de lavagem e em frações de 1,5 ml para o gradiente de NaCl.

A cromatografia de exclusão por tamanho foi aplicada a proteína TpN15 em tampão 3A (20 mM tampão fosfato pH 7,6; 150 mM NaCl). Os passos cromatográficos são: equilíbrio da coluna com 5 volumes de tampão 3A; injeção da amostra e eluição com fluxo de 0,5 ml por minuto com pressão de 1,8 MPa (1,5 MPa da coluna + 0,3 MPa do sistema).

5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A análise dos extratos proteicos e das frações cromatográficas foi feita em géis de poliacrilamida a 15%. As amostras foram preparadas conforme descrito por (LAEMMLI, 1970), utilizando 5 μ L do tampão de amostra 4x para cada caso e aquecidas a 95°C por 5 minutos, com um curto ciclo de centrifugação, o volume total preparado foi aplicado nos géis de poliacrilamida 15% de 0,75mm de espessura e submetidos à eletroforese com 20 mA de corrente por gel. Os géis foram corados com azul de coomassie e descorados em metanol e ácido acético.

5.9 Caracterização Estrutural das Proteínas Recombinantes

5.9.1 Dicroísmo Circular (CD)

Através da análise do espectro de dicroísmo circular pode-se verificar o conteúdo de estrutura secundária e inferir enovelamento das proteínas recombinantes. As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em espectro polarímetro JASCO J-815 (Hachioji, Tokio, Japão) equipado com um controlador de temperatura acoplado a um banho. Mediu-se a elipsidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm, com uma velocidade de 100 nm/min, sendo feitas no total 10 leituras.

Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipsidade molar por resíduo ($[\theta]_{MRW}$), em miligraus.cm².dmol⁻¹, que é definida pela equação (ADLER *et al.*, 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c} \quad (1)$$

Onde θ_{obs} é a elipsidade observada em graus, MRW é o peso molecular médio dos resíduos da proteína, d é o caminho óptico da cubeta em centímetros e c é a concentração da proteína em mg/mL. O MRW é calculado dividindo-se o peso molecular da proteína pelo número de resíduos.

A concentração de amostra variou de 0,1 – 0,5 mg/mL em tampão fosfato 20 mM pH7,5 e 1 mm o caminho óptico da cubeta.

A desnaturação térmica foi realizada variando a temperatura de 20°C a 90°C e o renovelamento de 90°C a 20°C com aquisição de espectros de dicroísmo circular (de 190 nm a 260 nm) a cada variação de 5°C. As curvas foram analisadas utilizando o programa estatístico Origin® 8.0.

5.9.2 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

O estado de oligomerização e agregação das proteínas purificadas foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz. Nessa técnica é possível determinar o raio das moléculas em suspensão e estimar suas massas. Quando uma fonte corrente de luz como um laser incide sobre partículas em suspensão, há alteração de frequência da luz espalhada em relação a frequência da luz incidente (efeito Doppler). Esta alteração resulta em mudanças na intensidade do feixe. O coeficiente de difusão (DT) é determinado a partir da taxa de decaimento de intensidade e utilizada para calcular o raio hidrodinâmico (Rh) de proteína através de equação de Stokes-Einstein ($DT = kBT (6\pi\eta Rh)^{-1}$, onde T é a temperatura em Kelvin, kb é constante de Boltzmann e η é a viscosidade do solvente). A aquisição dos dados foi feita no equipamento Dyna Pro Nano Star (Wyatt Technology, Santa Barbara, Califórnia, EUA) e a análise dos dados foi realizada utilizando o software Dynamics V7.

5.9.3 Modelagem de Proteínas Recombinantes para Análise Estrutural

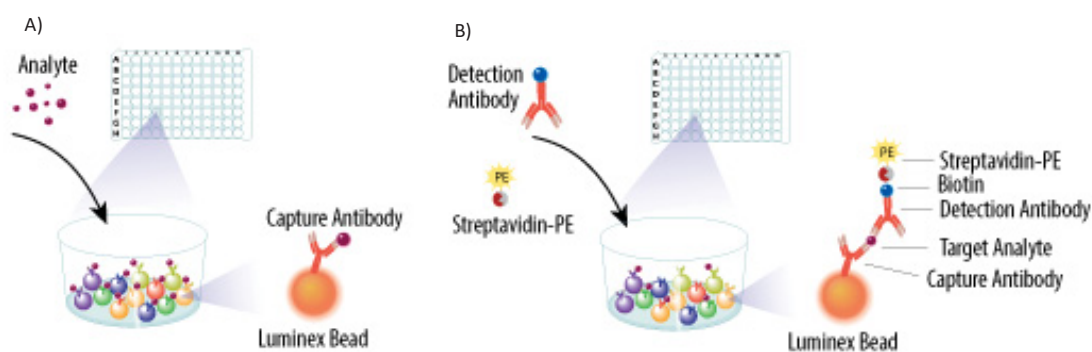
Proteínas com estrutura já descrita são usados como modelo para a geração de modelos estruturais para as proteínas TpN17, TmpA e TpN15 pela modelagem baseada na homologia de sequencias implementado no programa MODELLER. O alinhamento foi construído com base em homologia de estrutura secundária como disponível em HHpred Servidor (SALI & BLUNDELL, 1993; SÖDING, BIEGERT, & LUPAS, 2005). Para garantir a amostragem conformacional suficiente, um conjunto de 50 modelos foi construído, a partir do qual o melhor modelo final foi selecionado com base na avaliação da estereoquímica, a função objetivo de MODELLER (pontuação DOPE) e por inspeção visual. Esses modelos foram minimizados utilizando o algoritmo mais íngreme descida minimização como implementado no software UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Cadeias de sites incompletos foram substituídos usando Dunbrack rotamero biblioteca (DUNBRACK, 2002). Para a proteína TpN47 forma usados dos dados da estrutura cristalográfica (código PDB número: 1O75) (DEKA, MACHIUS, NORGARD, & TOMCHICK, 2002).

5.10 Ensaios Sorológicos

Na metodologia de microarranjo líquido, microesferas (beads) servem como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo, que são detectadas por uma ou mais moléculas de captura acopladas à superfície das microesferas. Como anticorpos, antígenos peptídeos ou ácidos nucleicos.

As microesferas, obtidas comercialmente da empresa Luminex (Austin, Texas, EUA) são sintetizadas contendo dois cromóforos que emitem fluorescência na faixa do vermelho-infravermelho do espectro de luz. Os cromóforos são combinados em proporções definidas para cada tipo de microesfera formando uma cor única, que lhe confere um código de identificação. Isto permite a criação de diferentes códigos de cor para as microesferas. Dessa forma, em um único ensaio diferentes moléculas alvo podem ser identificadas por moléculas de captura, cada qual acoplada a microesferas de um código de identificação diferente.

FIGURA 2: ESQUEMA ENSAIO POR MICROARRANJO LÍQUIDO LUMINEX

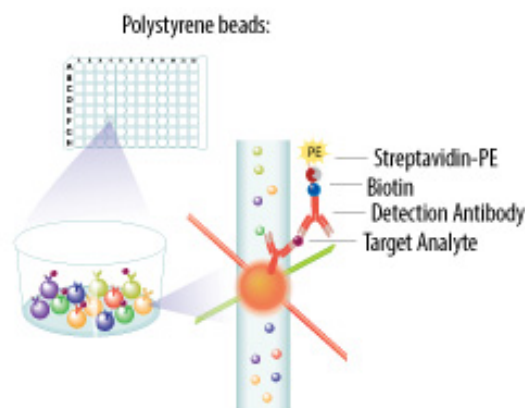


Legenda: A) Esquema de acoplamento dos antígenos às microesferas. B) Ligação de Anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (Luminex™).

Para os ensaios, as moléculas de captura, sejam antígenos ou anticorpos, são ligadas covalentemente às microesferas num processo chamado de acoplamento (figura 2). O acoplamento pode ser feito através de reações envolvendo os grupos carboxílicos na superfície das microesferas e os grupos amino primários presentes nos anticorpos ou nos antígenos. Neste trabalho, o acoplamento foi realizado através da ativação da superfície das microesferas utilizando EDC (1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e sulfo-NHS (N-Hidroxisuccinimida). A reação processa-se rapidamente através de um intermediário de éster ativo. Os grupos carboxila na superfície das microesferas são ativados com EDC, que

depois reagem de modo a formar um intermediário ativo O-Acylsoureia. Após a adição de sulfo-NHS forma-se um éster mais estável, que reage com as aminas primárias (grupos NH_2) dos antígenos para formar uma ligação covalente (ligação amida) entre as microesferas e os antígenos.

FIGURA 3: ESQUEMA, SISTEMA DE LEITURA DE MICROESFERAS POR LUMINEX



Legenda: Fluxo de laser duplo para reconhecimento da microesfera e o conjugado antígeno- Anticorpo-Fluorocromo de forma qualitativa e quantitativa (Luminex™).

Durante o ensaio, a detecção da ligação da molécula-alvo à molécula de captura necessita ainda de uma molécula de revelação ou molécula-repórter (figura 3). Em geral a revelação é feita utilizando-se, por exemplo, um anticorpo ou sonda que se liga à molécula-alvo, sendo que o anticorpo ou sonda está marcado com a molécula fluorescente, sendo neste caso a ficoeritrina. A ficoeritrina é excitada por lasers do sistema Luminex e a fluorescência emitida, proporcional à quantidade de molécula-alvo ligada na microesfera, é detectada e quantificada pelo sistema. O ensaio faz uma medida indireta, que consiste do acoplamento de antígenos às microesferas, visando a interação desses com anticorpos IgG específicos presentes em amostras de sangue (soro) de indivíduos infectados. A revelação desta interação é realizada pela ligação de um anticorpo secundário para IgG humano conjugado com a molécula fluorescente de R-Ficoeritrina.

Utilizando um painel de soros previamente caracterizados, sensibilidade é definida como o número de casos positivos, obtido experimentalmente, dividido pelo total de casos de verdadeiros positivos presentes no painel.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FN}} = \frac{\text{Número de verdadeiros positivos}}{\text{Numero de pacientes com esta doença}}$$

(VP:Verdadeiros positivos, FN: Falsos negativos)

Especificidade é o número de resultados negativos em pessoas que não tem a doença (resultados verdadeiros negativos nos controles):

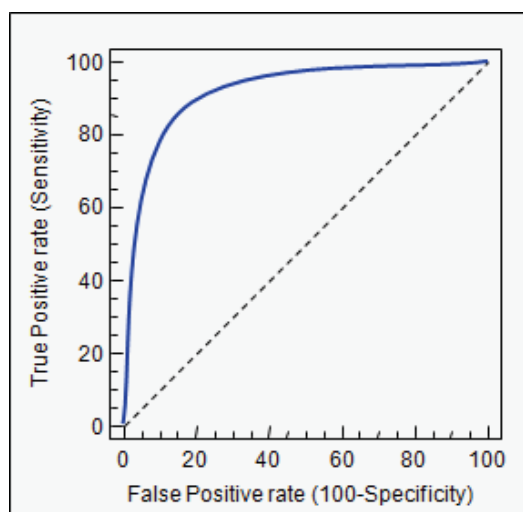
$$\text{Especificidade} = \frac{\text{VN}}{\text{VN+FP}} = \frac{\text{Número de verdadeiros negativos}}{\text{Numero de controles}}$$

(VN:Verdadeiros negativos, FP: Falsos positivos)

Geralmente, a sensibilidade e a especificidade são características difíceis de conciliar, isto é, é complicado aumentar a sensibilidade e a especificidade de um teste ao mesmo tempo. As curvas ROC (receiver operator characteristic curve) são uma forma de representar a relação, normalmente antagônica, entre a sensibilidade e a especificidade de um teste diagnóstico quantitativo, ao longo de um contínuo de valores de "cutoff".

Para construir uma curva ROC traça-se um diagrama que represente a sensibilidade em função da proporção de falsos positivos (1- Especificidade) para um conjunto de valores de "cutoff point" Figura 4.

FIGURA 4: GRÁFICO DE CURVA ROC



Legenda: Modelo de interpretação da Curva ROC, onde o diagrama corresponde a uma análise variada do ponto de *cutoff* em relação a sensibilidade e especificidade (ROC curve analysis MedCalc)

5.10.1 Amostras Sorológicas Analisadas

Os imunoensaios foram realizados com painéis de soros validados, isto é, as amostras positivas e negativas para sífilis foram previamente avaliadas AEQ/ANVISA/MS que é um painel de amostras sorológicas do Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ/ANVISA/MS) em Imuno-hematologia e Sorologia que foi uma das estratégias traçadas pelo Ministério da Saúde/ANVISA no contexto do PBQP (Programa Brasileiro de Qualidade e Produtividade - Meta Mobilizadora “Sangue com Garantia de Qualidade em Todo seu Processo até 2003”). Dada sua relevância, o AEQ/ANVISA/MS continuou existindo mesmo com o fim da Meta Mobilizadora e, atualmente, a legislação prevê como obrigatória a participação dos Serviços de Hemoterapia em pelo menos um programa de controle de qualidade externo.

Os testes foram feitos em três grupos:

Grupo I: Realizados no Laboratório de desenvolvimento de imunoensaios do ICC (Instituto Carlos Chagas, Curitiba/PR) O painel AEQ/ANVISA de 192 amostras é composto de 30 amostras positivas para sífilis, 7 controles sem anticorpos (branco), 142 controles sorologias positivas para hepatites virais, HIV, HTLV e doença de Chagas, e 13 controles negativos.

Grupo II: Realizados no Laboratório de desenvolvimento de imunoenaios do ICC (Instituto Carlos Chagas, Curitiba/PR) conjunto de amostras do grupo I acrescido de 192 amostras provenientes do painel PI - Painel Internacional (Sera Care life Science Inc.). O painel internacional (Sera Care Life Science Inc.) é composto de amostras genotipadas não diluídas universais de soros para HIV, HLTV, Hepatites virais, doença de Chagas e controles negativos.

Grupo III: Realizados no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, LATED-BioManguinhos – FIOCRUZ/RJ) com amostras 3 amostras positivas provenientes do painel AEQ (ANVISA) e 22 amostras positivas provenientes do painel INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ/RJ), 11 amostras positivas provenientes do IPEC (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI- Instituto Nacional de Infectologia) e 10 amostras negativas proveniente do LATED.

5.10.2 Ensaios de Acoplamento dos Antígenos às Microesferas

Troca de tampões.

A primeira etapa do processo consistiu em substituir os tampões dos antígenos por outros que sejam quimicamente mais compatíveis com a reação de acoplamento. Os antígenos tiveram o tampão original trocado pelo MÊS pH 5,5, Fosfato pH 7,5 e Carbonato pH 9,5. A troca foi realizada em filtros CENTRICON (Milipore Ireland Ltd.) com centrifugação de 9300 x g à 4°C. O acoplamento foi avaliado nas concentrações de 25µg a 100µg dos antígenos.

Após a troca dos tampões, os antígenos foram quantificados no espectrofotômetro Nanodrop e diluídos de maneira que houvesse uma massa de 25µg – 100 µg disponível para o acoplamento. As reações de acoplamento foram realizadas em placas e as microesferas contadas no contador automático TC-20 da Bio-Rad (Richmond, California). Avaliadas frente a um pool de amostras positivas para definir as melhores condições (pH e concentração de antígeno) de acoplamento para cada antígeno. Também foram acoplados antígenos sem a troca dos tampões, com o objetivo de comparar a influência desta troca nos resultados. Como não foram observadas variações significativas entre os resultados obtidos com e sem a troca de tampões, optou-se por continuar os testes sem realizar esta troca, em função da

considerável perda de antígenos resultante deste processo. As melhores concentrações de antígenos encontradas foram 25µg para TpN17, 50µg para TpN47, 80µg para TmpA e 70µg para TpN15.

5.10.3 Analise estatística

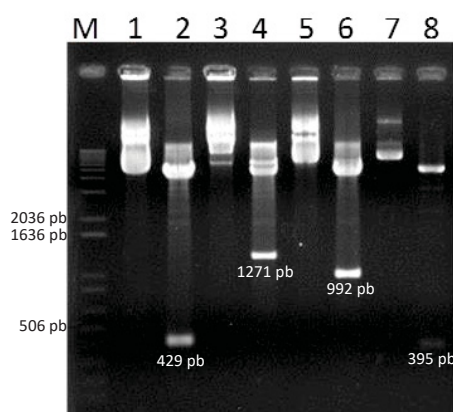
As análises de Curva ROC sensibilidade e especificidade foram obtidas com uso do software GrafpadPrism6.

6. RESULTADOS

6.1 Subclonagem em Vetor de Expressão das Proteínas Recombinantes TpN17, TpN47, TmpA e TpN15

Os fragmentos de DNA contendo as sequências codificadoras das proteínas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 foram isoladas do vetor pUC57 através de digestão com as enzimas de restrição BamHI e HindIII e purificação de gel. Estes fragmentos foram ligados no vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. O processo de subclonagem foi realizado com êxito, já que ao serem clivados com as enzimas de restrição (BamHI e HindIII), todos os clones derivados do pET28a liberaram o inserto com o tamanho correspondente ao fragmento esperado (Figura 5).

FIGURA 5: ANÁLISE DOS CLONES POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE



Legenda: Gel de agarose (1,0%), corado com brometo de etídio, mostrando os fragmentos das sequências codificadoras dos antígenos de *Treponema pallidum* em vetor de expressão (pET28a) após digestão enzimática com BamHI e HindIII. A: M. Marcador molecular (1kb Ladder Gibco). 1: TpN17 não digerido; 2: TpN17 digerido; 3: TpN47 não digerido; 4: TpN47 digerido; 5: TmpA não digerido; 6: TmpA digerido; 7: TpN15 não digerido; 8: TpN15 digerido.

Além das análises dos clones através da digestão com enzimas de restrição, os mesmos foram sequenciados. As sequências nucleotídicas foram analisadas com o auxílio dos *softwares* STADEN package e GeneDoc, tendo sido confirmada a identidade das sequências de nucleotídeos, sem alterações, para os clones correspondentes as proteínas TmpA, TpN47, TpN15 e TpN17.

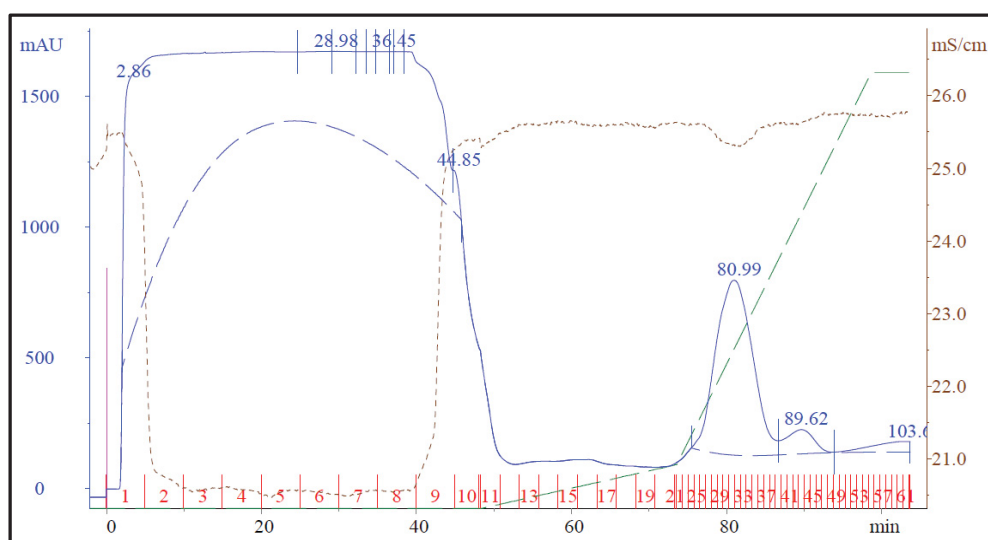
Após a confirmação dos clones no pET28a por sequenciamento do DNA, os plasmídeos contendo as proteínas de interesse foram utilizados para transformação de células *E. Coli* BL21(DE3) -Star. Para os testes de expressão, uma das colônias foi inoculada em meio líquido e então submetidas aos testes de expressão e purificação.

6.2 Purificação e Caracterização da Lipoproteína de Membrana TpN17

Testes de expressão realizados no caso da TpN17 revelaram que as melhores condições para expressão desta proteína são incubação à temperatura 25°C, tempo de indução com IPTG de 4 horas e agitação de 200 rpm. Os processos de obtenção e preparo do extrato estão descritos detalhadamente na metodologia.

A TpN17 foi purificada primeiramente pelo método de cromatografia de afinidade e posteriormente as frações mais puras com bandas equivalentes a 17 kDa foram usadas na cromatografia de troca catiônica, conforme descrito na metodologia.

FIGURA 6: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN17.



Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por afinidade da proteína TpN17.

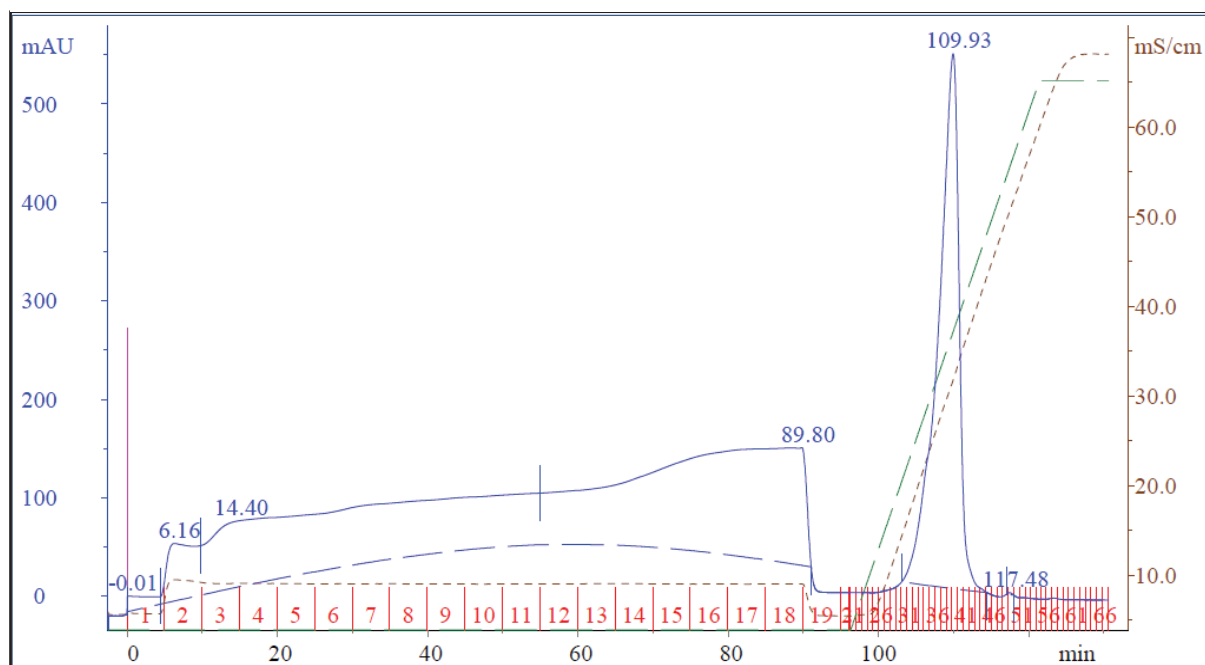
A (Figura 6) mostra o cromatograma correspondente ao primeiro passo de purificação da proteína TpN17. As frações de 1 a 11 correspondem ao extrato aplicado à coluna e não ligado à resina. As frações de 12 a 20 correspondem ao gradiente de 20 a 50 mM de imidazol. As frações de 21 a 61 com ao gradiente de 50 – 500 mM de imidazol.

FIGURA 7: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE PROTEÍNA TPN17

Legenda: Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie para análise das frações da cromatografia para purificação da proteína TpN17. M: Marcador Bench Mark (Invitrogen). I: Extrato solúvel de TpN17 não purificado. As demais amostras correspondem às frações da cromatografia de afinidade conforme a numeração indicada.

Alíquotas das frações foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% (Figura 7) para determinar em quais frações a TpN17 estava presente. A proteínas TpN17 eluiu a partir da fração 28 aparecendo ao longo de todo o gradiente de imidazol, embora nas frações de 28 a 37 há um pico da TpN17. A presença de contaminantes de *E. coli* requer uma segunda etapa de purificação. Assim, as frações 28 a 37 da cromatografia de afinidade foram reunidas e diluídas 6 vezes em 20 mM de tampão fosfato pH 6,8 e usadas na cromatografia de troca catiônica.

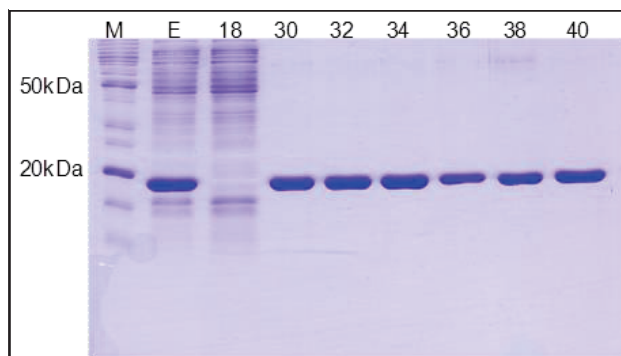
FIGURA 8: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA TPN17



Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por troca catiônica da proteína TpN17.

A (Figura 8) mostra o cromatograma obtido da purificação da TpN17 por cromatografia de troca catiônica. Todas as frações, incluindo desde injeção de amostra, lavagem e gradiente de NaCl foram coletadas e alíquotas das frações foram analisadas em gel de poliacrilamida. As frações de 30 a 45 (Figura 9) analisadas em gel de poliacrilamida 15% contém bandas homogêneas e com tamanho correspondente a TpN17.

FIGURA 9: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN 17



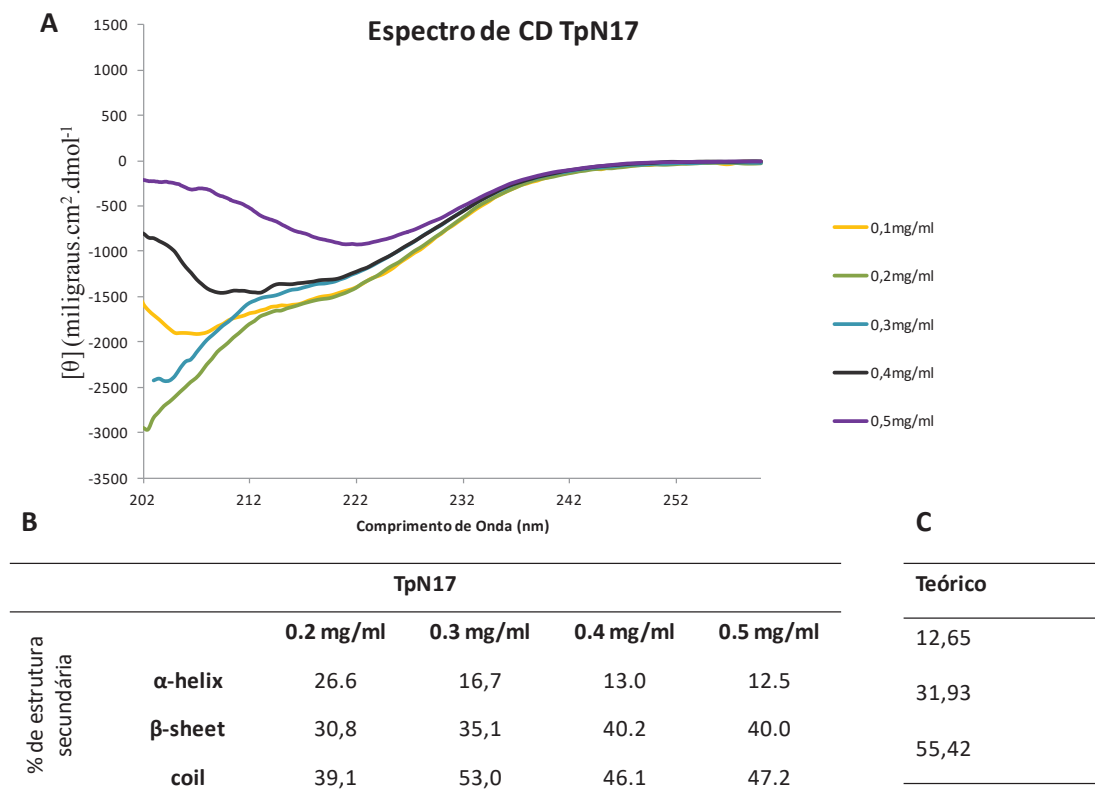
Legenda: Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie para análise da purificação da proteína Tpn17 por troca iônica. M: Marcador Bench Mark (Invitrogen). I: Amostra injetada na coluna de SP-Sepharose.

6.3 Caracterização da Proteína Tpn17

Após sua purificação, a proteína Tpn17 foi submetida a uma série de análises visando obter dados sobre seu conteúdo de estruturas secundárias, estabilidade térmica e estado de oligomerização que são importantes para as futuras aplicações da proteína.

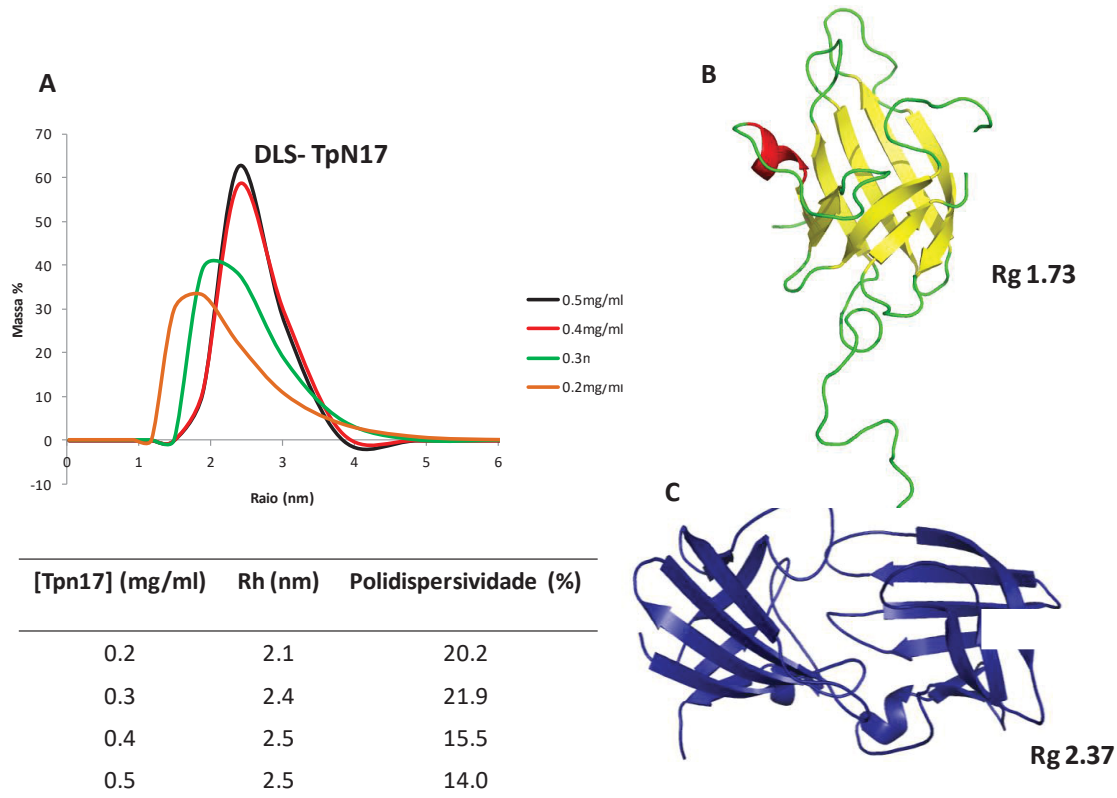
As análises por CD e DLS revelaram alterações estruturais associadas às diferentes concentrações e condições de tampão testadas. Na (Figura 10A) são mostrados os diferentes espectros de CD de acordo com as variações de concentração da Tpn17. À medida que se aumenta a concentração da Tpn17 (Figura 10B) a proporção de estruturas α -hélice e folhas- β aumenta e aproxima-se da porcentagem de conteúdo de estruturas secundárias teórico previsto para esta proteína (Figura 10C).

FIGURA 10: AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPN17



Legenda: Análise do conteúdo de estrutura secundária de Tpn17 em diferentes concentrações. A) espectros de dicroísmo circular B) Resultado da deconvolução dos espectros de dados de A através do programa CDNN (Applied Photophysics) com o conteúdo estimado de cada tipo de estrutura secundária. C) Conteúdo de estrutura secundária teórico para a Tpn17 conforme predição com o método Modeller.

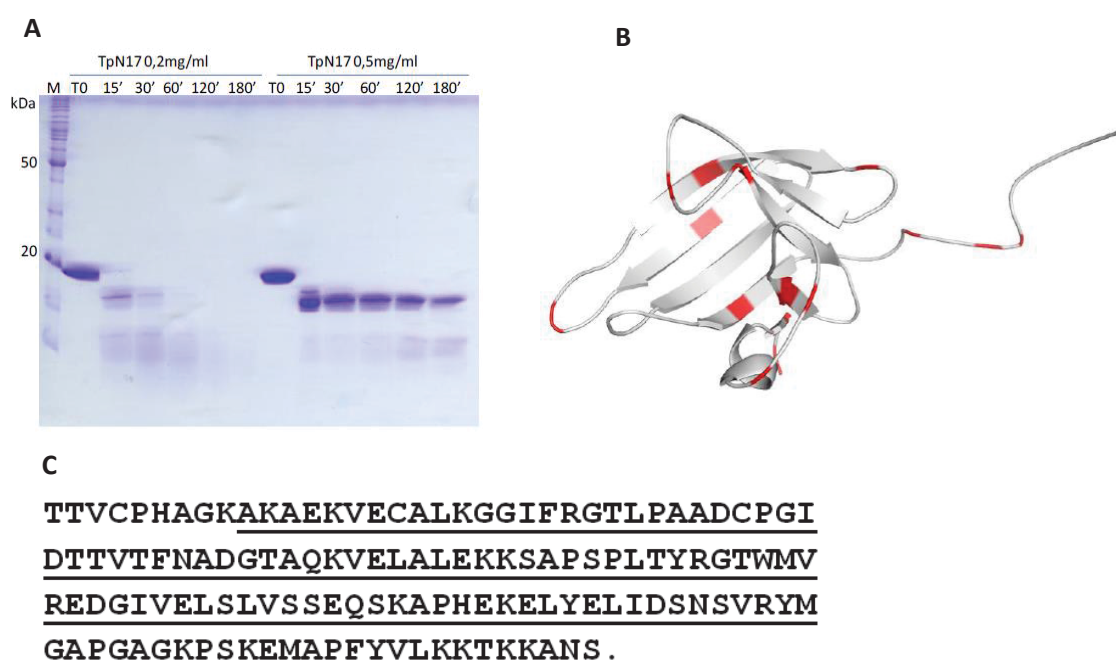
FIGURA 11: ANÁLISE DE ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA TPN17



Legenda: A) superior: Gráfico de espalhamento dinâmico de Luz; Inferior: Dados de espalhamento dinâmico de luz da Tpn17 em várias concentrações. B) superior: Modelo tridimensional gerado por homologia de Tpn17 monomérica e Inferior: dimérica.

As análises de DLS (Figura 11A, painel inferior) demonstram que em concentrações menores (0,2 mg/mL) o raio hidrodinâmico é próximo do raio de giro correspondente ao monômero desta proteína Rg: 1,73 (figura 11B, painel superior) enquanto que em concentrações maiores (0,5 mg/mL) o raio hidrodinâmico se aproxima ao raio de giro do dímero Rg: 2,37 desta proteína (figura 12 B) painel inferior. Isto indica que proteína pode apresentar diferentes estados oligoméricos dependendo da concentração.

FIGURA 12: ANÁLISE ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TPN17

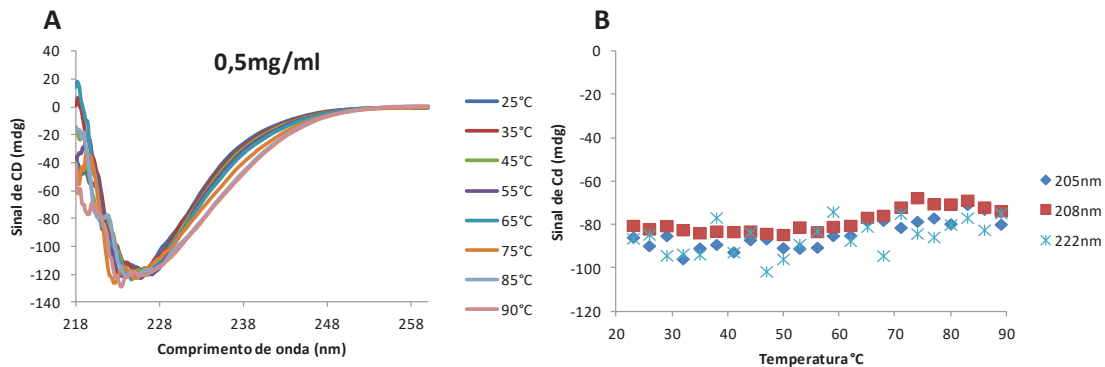


Legenda: Ensaio de proteólise limitada de Tpn17 nas concentrações de 0.2 mg/mL e 0.5 mg/mL. A) Gel de poliacrilamida 18% visualizado por coloração de Coomassie. B) Modelo tridimensional da estrutura de Tpn17 gerado por homologia. Sítios de digestão da tripsina indicados em vermelho; C) Sequência de Tpn17 (GI:15639426). Estão sublinhados os resíduos correspondentes às regiões identificadas por espectrometria de massas.

A técnica de proteólise limitada permite identificar regiões não estruturadas em proteínas. Neste caso ela foi usada para verificar as diferenças conformacionais de Tpn17 dependente de sua concentração.

Para esse ensaio usamos a tripsina que cliva resíduos de lisina e arginina. O resultado do teste de proteólise para a Tpn17 em concentrações de 0,2 mg/mL e 0,5 mg/mL (Figura 12A) demonstram que na concentração menor ela é totalmente degradada durante o tempo do ensaio enquanto que na concentração maior uma banda persiste. Este resultado indica uma mudança conformacional (Figura 12B) que expõe os sítios de clivagem de tripsina quando Tpn17 está em menor concentração. Estes sítios não ficam expostos quando a proteína se encontra mais concentrada. De acordo com o modelo tridimensional (Figura 12B) esses sítios estariam internalizados com a dimerização da Tpn17. A banda resistente à proteólise foi analisada por espectrometria de massas e os fragmentos peptídicos encontrados (figura 12C) são correspondentes a sequência da proteína Tpn17, demonstrando que as clivagens ocorreram na região da cauda de histidina N-terminal.

FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN17



Legenda: A) Análise de estabilidade térmica da proteína TPN17; B) Análise pontual do perfil de dicroísmo circular da proteína TPN17 em relação à temperatura

A (Figura 13A) mostra a análise do conteúdo de estrutura secundária da proteína TPN17 ao longo do processo de desnaturação. Observamos que esta proteína possui alta estabilidade térmica. Não houve perda significativa de conteúdo de estrutura secundária quando a solução de proteínas foi aquecida até 90°C. Como a intensidade do sinal de CD para esta proteína é bastante alto, ocorre aumento de voltagem, quando a voltagem é superior a 1000 volts a sensibilidade da medida é afetada. Assim optamos por realizar leituras pontuais em comprimentos de onda que remetem a estrutura secundária para que o aumento de voltagem não interferisse no espectro. Observamos que não ocorre perda significativa de estrutura secundária (Figura 13B) mesmo em altas temperaturas confirmando a alta estabilidade térmica desta proteína.

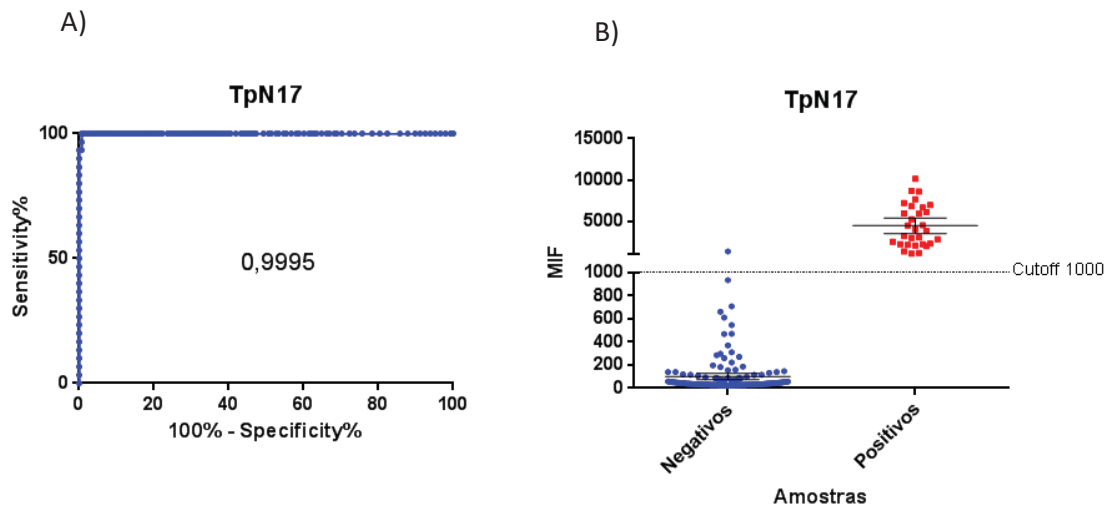
6.4 Testes Sorológicos com a Proteína TPN17

Para estudarmos a reatividade individual da proteína TPN17 recombinante utilizamos os soros do painel AEQ de amostras do grupo I.

A área da curva ROC de 0,9995 (Figura 14A) indica que a proteína TPN17 apresenta desempenho máximo como antígeno para estas amostras por identificar todas as 30

amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 154 amostras de 155 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 98,70% (Figura 14B).

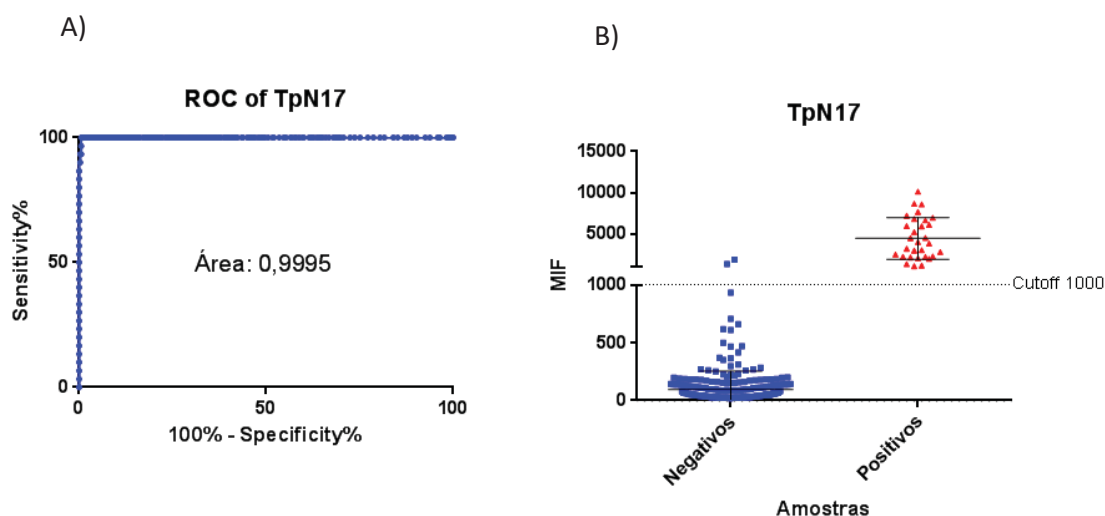
FIGURA 14: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO I



Legenda: Testes sorológicos para TpN17 com os soros do painel do grupo I. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9995; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=185 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Para melhor avaliarmos a especificidade individual da proteína TpN17recombinante testamos o antígeno TpN17 com amostras do grupo II. Assim como no teste anterior, a análise da curva ROC com área de 0,9995 (Figura 15A) mostra que a TpN17 apresenta desempenho máximo como antígeno para estas amostras por reconhecer todas as 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 341 amostras de 343 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 98,80% (Figura 15B).

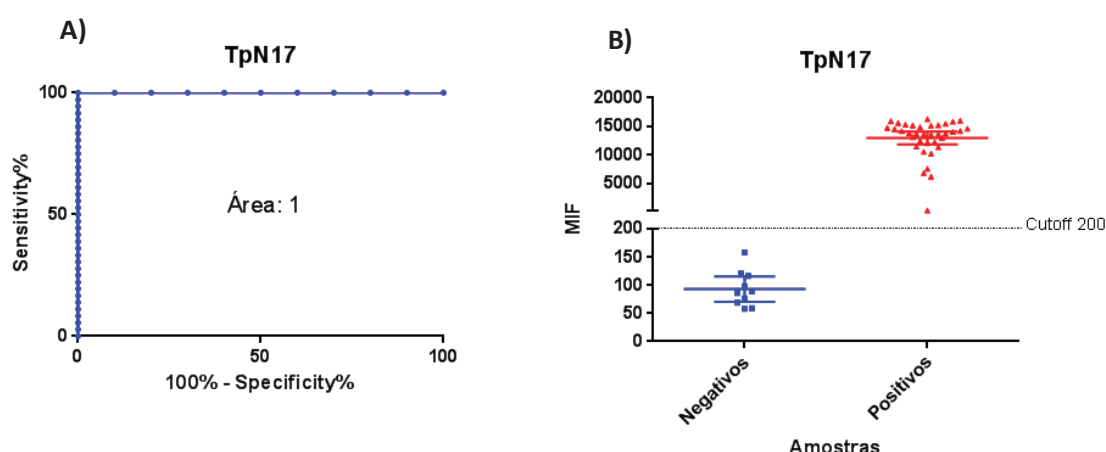
FIGURA 15: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO II



Legenda: Testes sorológicos para TPN17 com os soros do painel do grupo II. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9995; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=373 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Além dos testes sorológicos realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico do ICC, a proteína TPN17 foi testada frente ao grupo III (detalhado na metodologia) de amostras no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – BioManguinhos. A análise da curva ROC com área de 1,0 (Figura 16A) mostra que a TPN17 nestes ensaios apresenta excelente desempenho para servir como antígeno em imunodiagnóstico. TPN17 reconheceu todas as 36 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, todas as 10 amostras foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 100% (Figura 16B).

FIGURA 16: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TPN17 AMOSTRAS DO GRUPO III



Legenda: Testes sorológicos para TpN17 com os soros do painel do grupo III. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 1,0; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=46 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

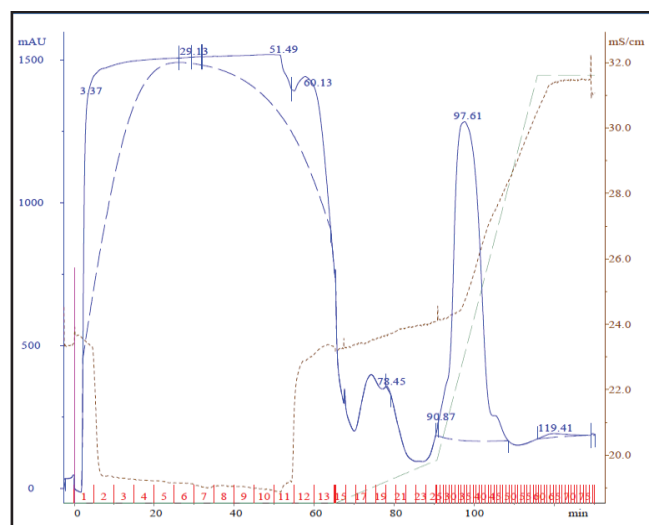
6.5 Purificação da Lipoproteína de Membrana TpN47

Testes prévios de expressão foram realizados conforme descritos na metodologia para determinar as melhores condições de expressão e purificação da TpN47. Igualmente a TpN17, as melhores condições encontradas foram 25°C de temperatura por um tempo de 4 horas sob agitação de 200 rpm.

Os processos de obtenção e preparo do extrato destas células estão descritos detalhadamente na metodologia. A TpN47 foi expressa na cepa *E. Coli* BL21(DE3) -Star em meio LB acrescido de canamicina, com pré inóculo de 100 ml e inóculo de 2L. Após atingir a DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 os inóculos foram incubados a 25°C por 30 minutos para aclimatar as células, após este período foi adicionado 0,5 mM de IPTG e a incubação prosseguiu a 25°C por 4 horas. A massa de células foi coletada por centrifugação e congeladas a -20°C. A massa de células foi descongelada e ressuspensa em tampão A com inibidor de protease Roche na proporção 1mg/mL obtendo um volume total de 50 mL. A lise foi feita no microfluitizador com 10 passagens e o lisado foi centrifugado e toda fração solúvel (sobrenadante) foi coletada e tratada com 1% sulfato de estreptomicina e novamente centrifugada e filtrada.

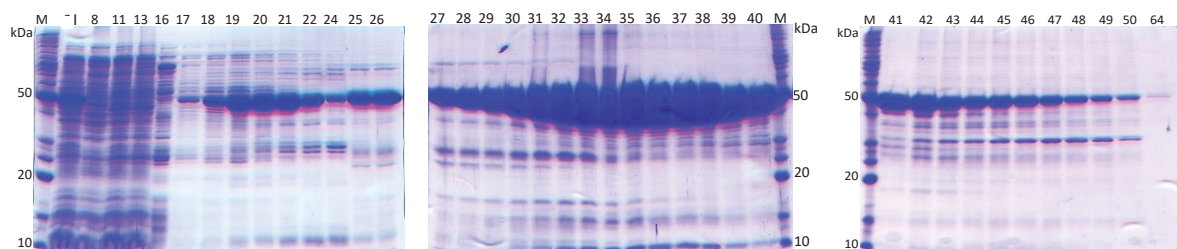
A TpN47 foi purificada primeiro pelo método de cromatografia de afinidade e depois as frações mais homogêneas com bandas equivalentes a 47 kDa foram usadas na cromatografia de troca iônica, conforme descrito na metodologia. A figura 15 mostra o cromatograma correspondente ao primeiro passo de purificação da proteína. As frações de 1 a 14 correspondem à etapa de injeção de amostra e proteínas não ligadas à resina de níquel. As frações 15 a 25 correspondem ao gradiente 20 – 50 mM de imidazol e as frações de 26 a 51 correspondem ao gradiente de 50 – 500 mM de imidazol.

FIGURA 17: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN47.



Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por afinidade da proteínaTpN47.

FIGURA 18: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN47

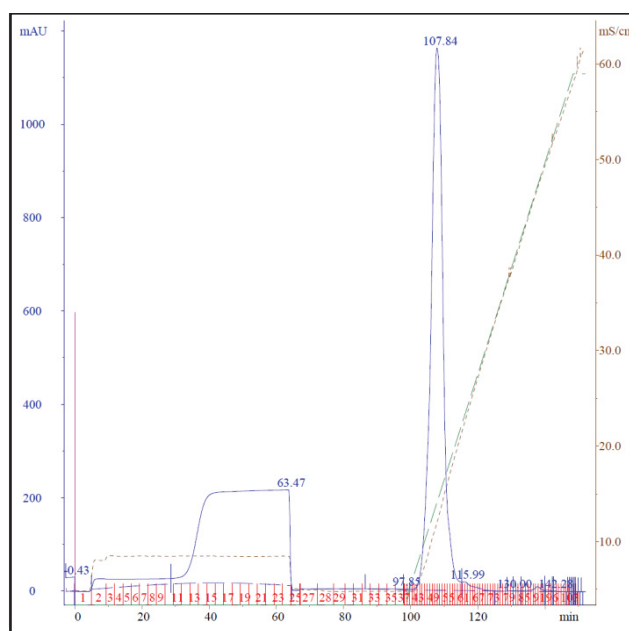


Legenda: Gel de poliacrilamida 13% corado com azul de coomassie. M: Marcador Bench Mark (Invitrogen). I: extrato solúvel da proteína TpN47 não purificado. As demais amostras correspondem as frações da purificação da TpN47

Alíquotas das frações correspondentes às etapas de injeção de amostra, lavagem e gradiente de imidazol foram coletadas e alíquotas foram analisadas em gel de poliacrilamida 15%. A figura 16 mostra o gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie, as frações de 26 a 49 correspondente ao pico mais evidente da cromatografia apresentaram tamanho esperado de 47 kDa correspondente a TpN47, também são observadas de bandas de contaminantes de *E. coli* demonstrando a necessidade de refinar a purificação desta proteína.

Assim, um segundo passo cromatográfico com a resina Q-Sepharose de 5mL foi realizado com as frações de 32 a 40 que apresentaram melhor grau de pureza diluídas 6 vezes em 20mM de tampão fosfato pH 7,4. A figura 17 mostra o cromatograma obtido na purificação por troca aniônica. As frações de 1 a 19 correspondem às etapas de injeção de amostra e lavagem da coluna, as frações de 21 a 50 ao gradiente de NaCl.

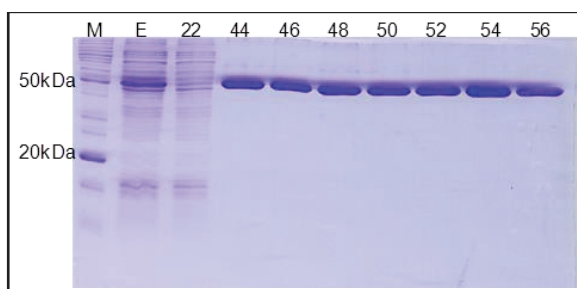
FIGURA 19: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN47



Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por troca aniônica da proteína TpN47.

Alíquotas de todas as frações correspondentes às etapas de injeção de amostra, lavagem e gradiente de NaCl foram coletadas e analisadas em gel de poliacrilamida 15% (Figura 19). As frações de 44 a 53 foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% e demonstraram alto grau de pureza da proteína TpN47.

FIGURA 20: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TPN47

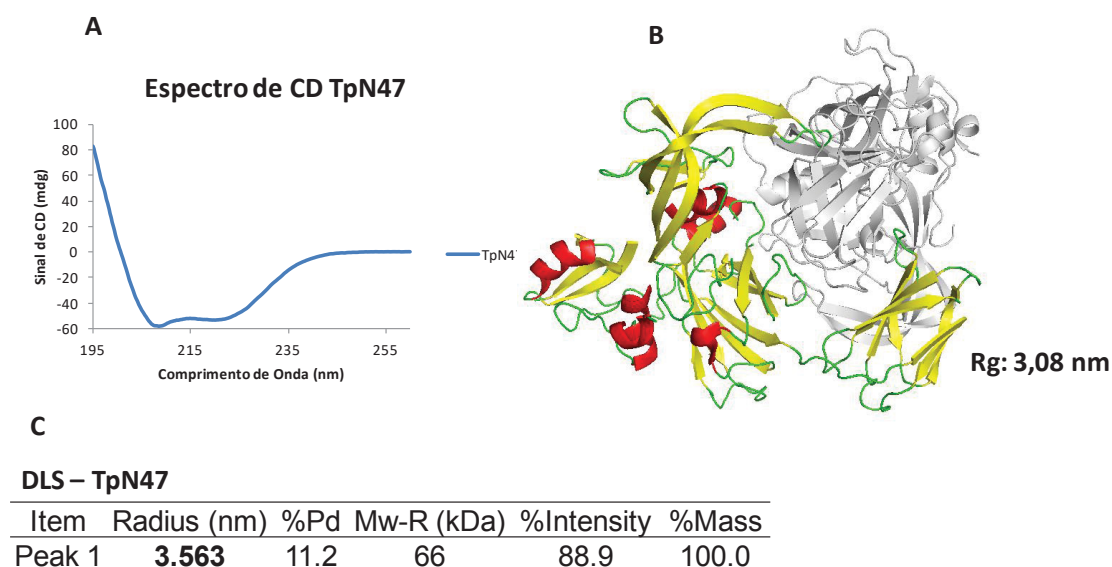


Legenda: Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie para análise de purificação da TPN47. M: Marcador Bench Mark (Invitrogen). I: frações da cromatografia de afinidade. D: Amostra diluída em Tampão fosfato pH 7,4.

6.6 Caracterização Estrutural da Proteína TPN47

O espectro de dicroísmo circular da proteína TPN47 (Figura 21A) indica que a proteína possui estrutura condizente com proteína rica em estruturas alfa-hélice e fita-beta caracterizados pelos mínimos em 208 nm, 222 nm (alfa hélice) e máximo em 198 nm. O platô observado entre 218 e 222 nm está associado à contribuição de regiões de estrutura fita- β . Relacionando o espectro de CD obtido com a estrutura tridimensional determinada (PDB:1075) na (Figura 21B), observamos que a TPN47 possui estrutura secundária de acordo com o esperado. Com os dados obtidos pelo DLS (Figura 21C) e relacionados com a estrutura tridimensional, observamos que o raio hidrodinâmico das moléculas em suspensão 3,5 nm está condizente com o dímero da proteína TPN47 (raio de giro de 3,08 nm). Esses dados indicam que a proteína está corretamente enovelada, tendo o dímero como forma mais estável e o tampão utilizado está adequado para os imunoenaios visto que não resulta na agregação da proteína.

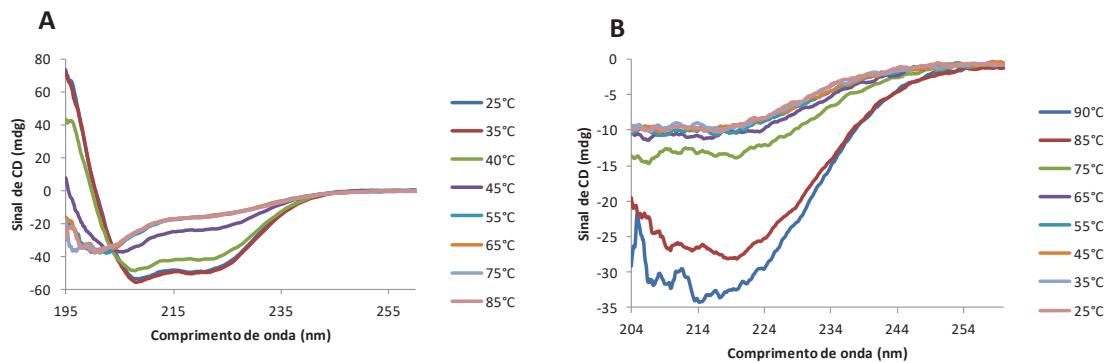
FIGURA 21: ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPN47



Legenda: A) Espectro de dicroísmo circular da proteína TPN47; B) Estrutura Tridimensional da Proteína TPN47 (PDB:1075); C) Medidas de raio, polidispersividade, massa, intensidade por Espalhamento dinâmico de Luz da proteína TPN47.

A estabilidade térmica da proteína recombinante TPN47 foi determinada por desnaturação com aumento de temperatura e coleta de dados por espectroscopia de dicroísmo circular. A figura 21 mostra a análise do conteúdo de estruturas secundárias da proteína TPN47 ao longo do processo de desnaturação. Não houve desnaturação proteica até 35°C. Acima desta temperatura houve perda gradativa da estrutura secundária, com desnaturação completa da proteína em temperaturas acima de 60°C (Figura 22A). Os ensaios de renaturação térmica (Figura 22B) desta proteína demonstraram que a TPN47 após sofrer desnaturação perde a capacidade de re-enovelamento.

FIGURA 22: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN47

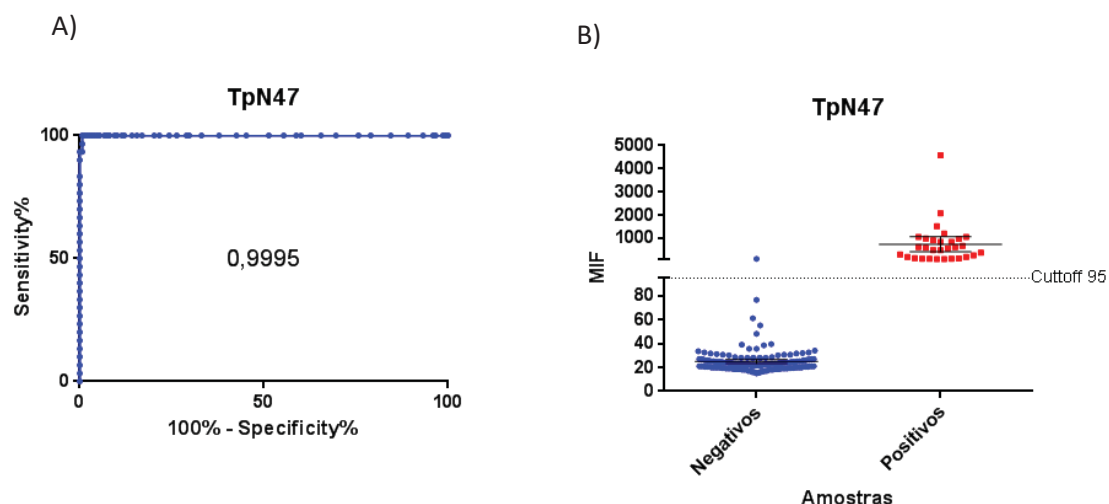


Legenda: Análise de estabilidade térmica da proteína TPN47 por dicroísmo circular. A) Desnaturação; B) Renaturação.

6.7 Testes Sorológicos com a Proteína TPN47

Para estudarmos a reatividade individual da proteína TPN47 recombinante utilizamos inicialmente os soros do painel AEQ de amostras do grupo I. A área da curva ROC de 0,9995 (Figura 23A) indica que a proteína TPN47 apresenta desempenho máximo como antígeno para estas amostras de soro por ter identificado todas as 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 154 amostras de 155 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 98,70% (Figura 23B).

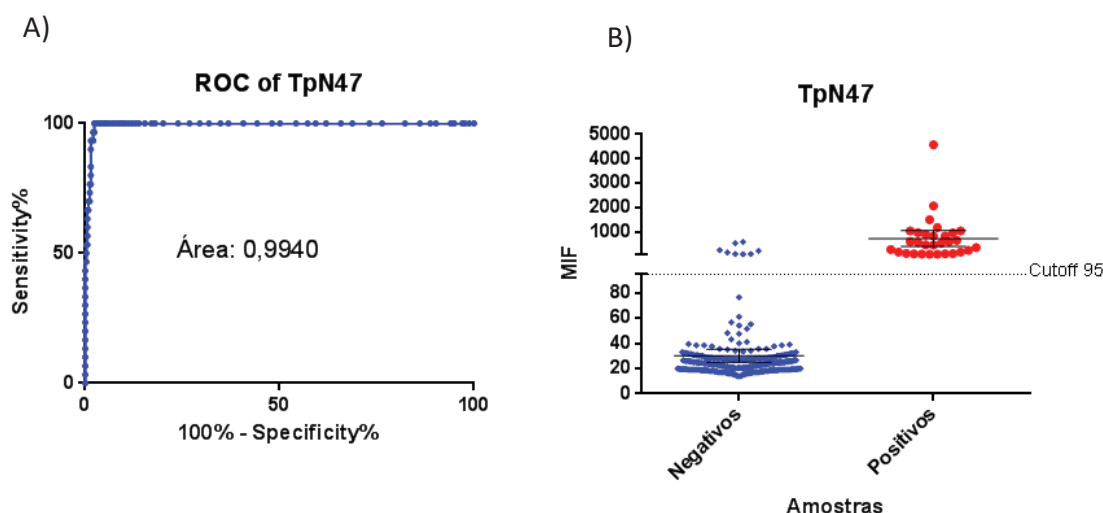
FIGURA 23: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO I



Legenda: Testes sorológicos para TPN47 com os soros do painel do grupo I. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9995; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=185 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Assim como para a TPN17, para melhor avaliarmos a especificidade individual da proteína TPN47 recombinate analisamos em conjunto aos painéis do grupo I também com os painéis do grupo II descritos na metodologia. A análise da curva ROC com área de 0,9940 (Figura 24A) mostra que a TPN47 apresenta desempenho máximo para estas amostras por reconhecer todas as 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 339 amostras de 343 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 97,70% (Figura 24B).

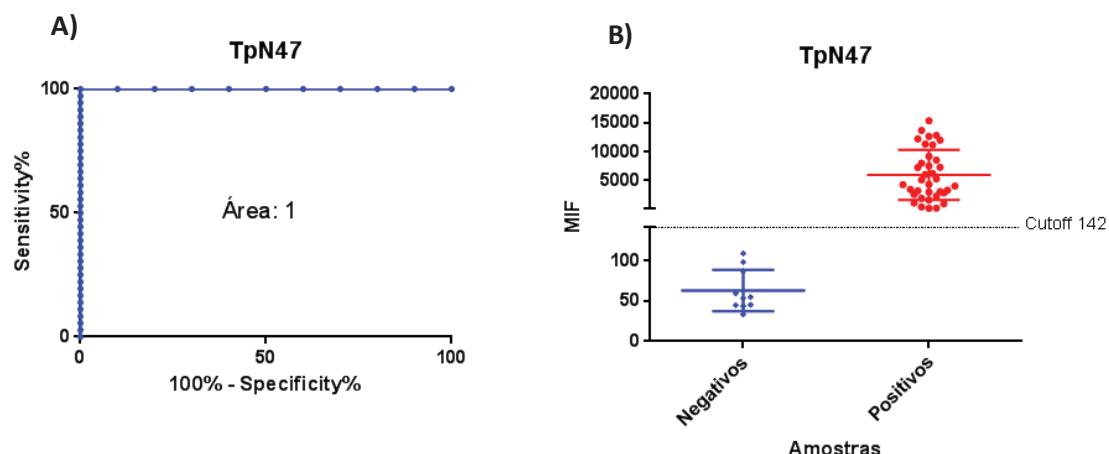
FIGURA 24: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO II



Legenda: Testes sorológicos para TPN47 com os soros do painel do grupo II. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9995; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=373 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Além dos testes sorológicos realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico do ICC, a proteína TPN47 foi testada frente aos soros do grupo III (detalhado na metodologia) de amostras no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – BioManguinhos. A análise da curva ROC com área de 1,0 (Figura 25A) mostra que a TPN47 apresenta desempenho excelente para servir como antígeno em imunodiagnóstico por reconhecer todas as 36 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, todas as 10 amostras foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 100% (Figura 25B).

FIGURA 25: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM APROTEÍNA TPN47 COM AMOSTRAS DO GRUPO III

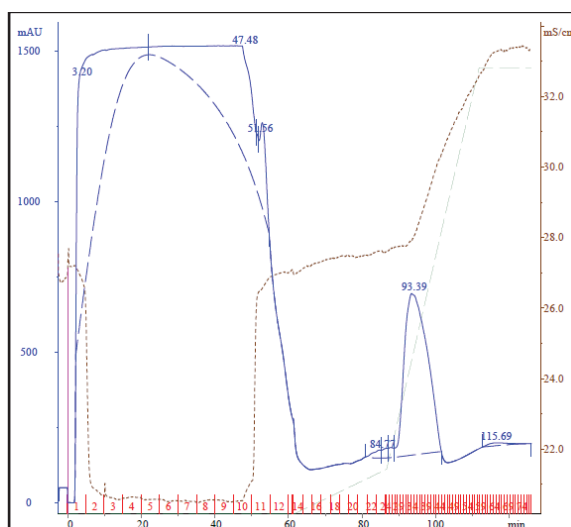


Legenda: Testes sorológicos para TPN47 com os soros do painel do grupo III. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 1,0; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=46 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

6.8 Purificação e Caracterização da Lipoproteína de Membrana TmpA

Foram realizados testes de expressão conforme descritos na metodologia para se determinar as melhores condições de expressão da proteína TmpA recombinante. Para esta proteína as melhores condições encontradas foram temperatura de 25°C pelo tempo indução de 4 horas sob agitação de 200 rpm. Após a indução a massa de células foi coletada por centrifugação e congeladas a -20°C. A purificação foi feita conforme descrito na metodologia e ocorreu em duas etapas de cromatografia no sistema ÄKTA sendo a primeira a cromatografia de afinidade em coluna de resina níquel de 5mL e o segundo passo por cromatografia de troca aniônica em coluna de resina Q-separasse de 5mL.

FIGURA 26: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TMPA

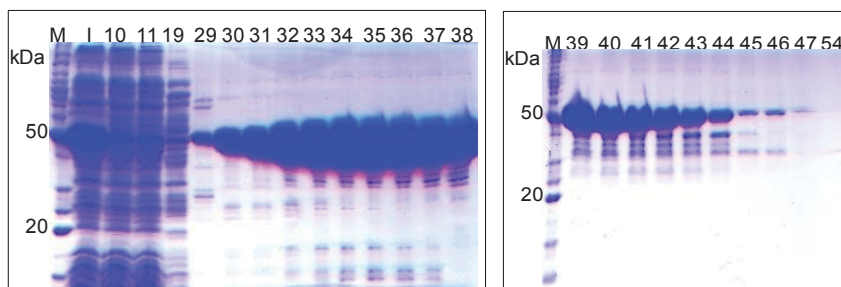


Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por afinidade da proteína TmpA.

Na (Figura 26), o cromatograma correspondente ao primeiro passo de purificação, as frações de 1 a 13 correspondem a etapa de injeção da amostra e proteínas não ligadas à resina. As frações de 14 a 24 correspondem ao gradiente de 20 – 50 mM de imizadol e as frações de 25 a 45 correspondem ao gradiente de 50 – 500 mM de imidazol.

Todas as frações correspondentes às etapas de injeção de amostra, lavagem e gradiente de imidazol foram coletadas e alíquotas de cada fração foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% para determinar a fração da TmpA. A figura 23 mostra que a proteína de interesse elui nas frações de 29 a 44. Bandas de proteínas contaminantes também são observadas nestas frações indicando a necessidade de refinar a purificação.

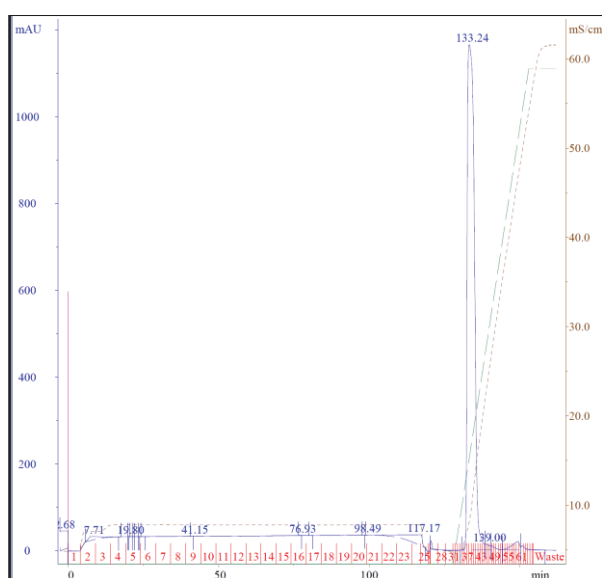
FIGURA 27: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TMPA



Legenda: Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie para análise da purificação. M: Marcador BenchMarck (Invitrogen). I: Extrato solúvel da proteína não purificada. As demais amostras correspondem as frações da purificação coletadas.

Assim, um segundo passo cromatográfico foi realizado com as frações de melhor grau de pureza (30 a 40) diluídas 6 vezes em 20 mM de tampão Fosfato pH 7,4 usando a resina Q-Sepharose de 5 mL. O cromatograma obtido da cromatografia de troca aniônica (Figura 28). As frações de 1 a 30 correspondem às etapas de injeção de amostra e lavagem, as frações de 31 a 60 correspondem ao gradiente de NaCl.

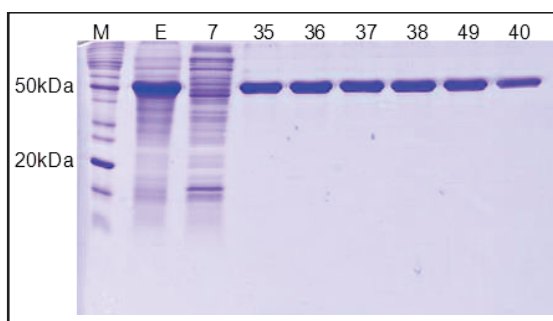
FIGURA 28: ANÁLISE DO CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TMPA



Legenda: Cromatograma da purificação por de troca aniônica da proteína TmpA.

Todas as frações correspondentes às etapas de injeção de amostra, lavagem e gradiente de NaCl foram coletadas e alíquotas de cada fração foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% para determinar a pureza da TmpA (Figura 29). A TmpA eluiu nas frações de 36 a 40 do gradiente de NaCl e apresenta alto grau de pureza.

FIGURA 29: AVALIAÇÃO DA CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA DA PROTEÍNA TMPA



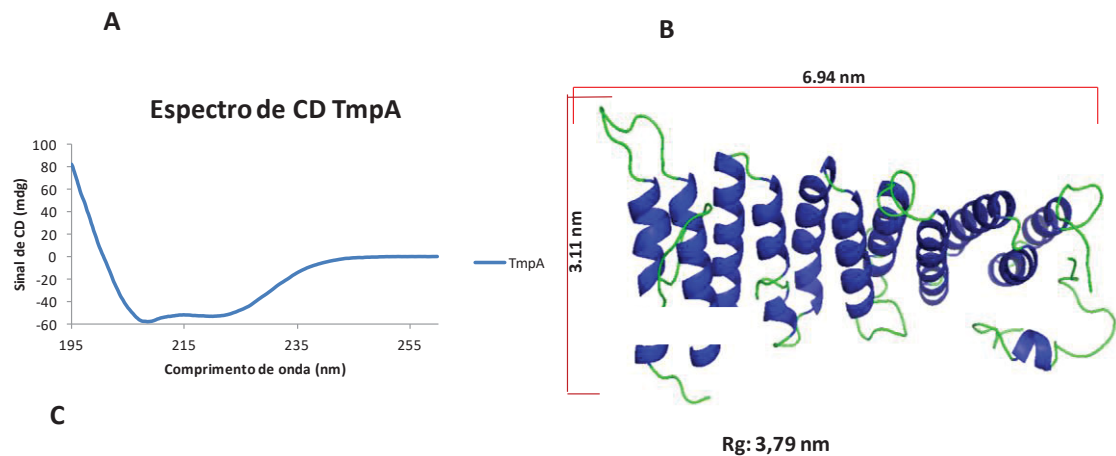
Legenda: Gel de poliacrilamida 15% coloração de Coomassie. M. Marcador Bench Mark (Invitrogen). I: Purificação de afinidade. As demais amostras correspondem a fração da purificação de TmpA.

6.9 Caracterização Estrutural da Proteína TmpA

Analisando o espectro de CD (Figura 30A) identificamos proteínas ricas em estrutura α -hélice. Assim, relacionando o perfil de CD obtido com o modelo predito da proteína TmpA (Figura 30B) notamos que o conteúdo de estrutura secundária está condizente com o esperado para esta proteína.

Os dados de DLS (Figura 30C), indica um raio condizente com um monômero de TmpA o raio de giro obtido por modelagem foi de 3,79 nm. Como a proteína TmpA de *T. pallidum* não possui estrutura tridimensional determinada, utilizamos softwares de modelagem estrutural detalhados na metodologia para construir um modelo por homologia de sua estrutura tridimensional. É importante ressaltar que a massa estimada está superestimada visto que sua estrutura terciária é alongada e o DLS estima uma massa a partir do raio determinado experimentalmente para uma proteína globular. Esses dados indicam que a proteína está corretamente enovelada, tendo o monômero como forma mais estável e o tampão utilizado está adequado visto que não resulta na agregação da proteína.

FIGURA 30: ANÁLISE DE CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TMPA



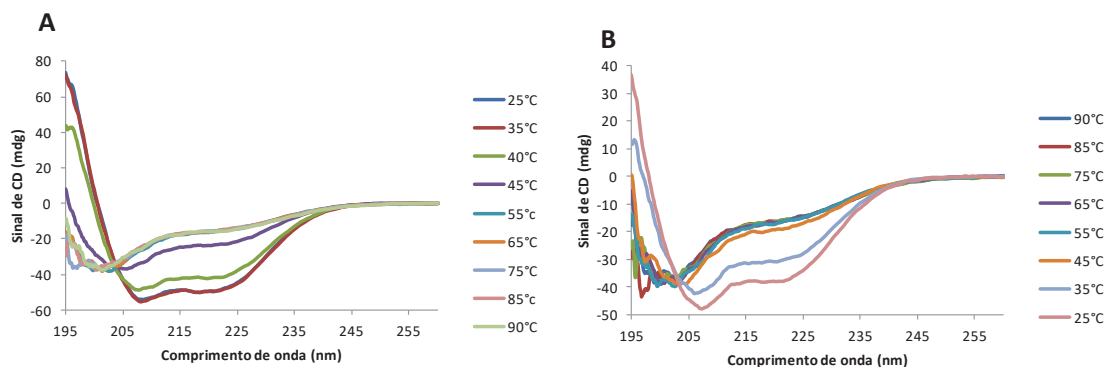
DLS – TpN47

Item	Radius (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)	%Intensity	%Mass
Peak 1	5.143	10.2	155	22.0	97.2

Legenda: A) Espectro de Dicroísmo Circular da proteína TmpA; B) Modelo estrutural da proteína TmpA e C) Raio, polidispersividade e massa obtidos por espalhamento dinâmico de luz da proteína TmpA.

Para a proteína recombinante TmpA não há desnaturação proteica até 35°C. Acima desta temperatura há perda gradativa da estrutura secundária, com desnaturação completa da proteína em temperaturas acima de 60°C (figura 28 A). A proteína TmpA demonstrou capacidade de renovelamento após sofrer desnaturação (figura 28 B). No entanto, o renovelamento não recupera o mesmo perfil de dicroísmo circular da proteína nativa.

FIGURA 31: ANÁLISE POR DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA TMPA

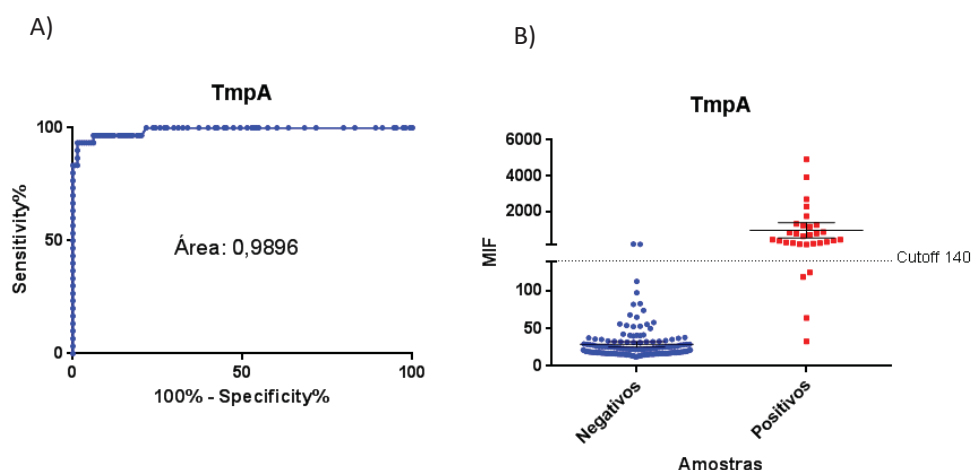


Legenda: Análise da estabilidade térmica por dicroísmo circular da proteína TmpA; A) Desnaturação; B) Renaturação.

6.10 Testes Sorológicos para a Proteína TmpA

Para estudarmos a reatividade individual da proteína TmpA recombinante utilizamos primeiramente os painéis de amostras AEQ do grupo I. A área da curva ROC de 0,9896 (Figura 32) indica que a proteína TmpA apresenta muito bom desempenho como antígeno para estas amostras de soro. TmpA recombinante identificou 26 das 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 76,50%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 153 amostras de 155 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 97,50% (Figura 32B).

FIGURA 32: AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO I

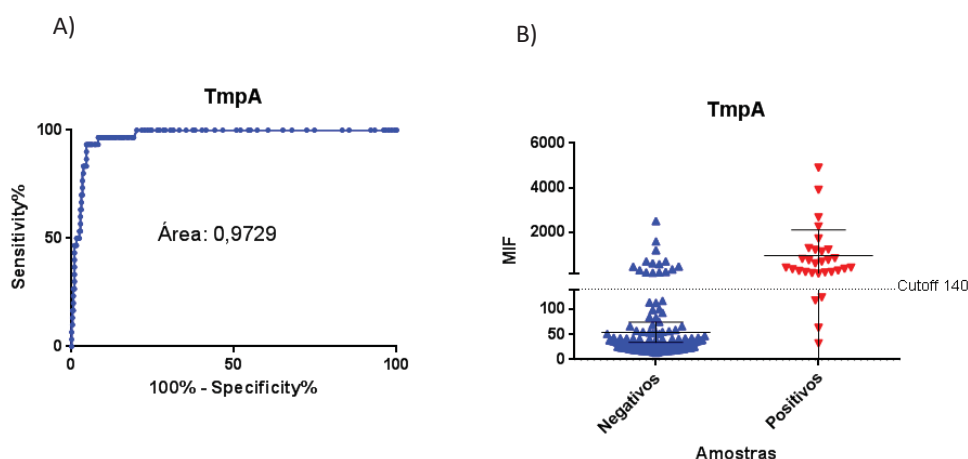


Legenda: Testes sorológicos para TmpA com os soros do painel do grupo I. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9896; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=185 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Para os testes da proteína TmpA recombinante com os painéis do grupo II, a curva ROC apresentou área de 0,8729 (Figura 33A) mostra que a TmpA apresenta bom desempenho para servir como antígeno em imunodiagnóstico. TmpA recombinante reconheceu 26 das 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 76,50%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 328

amostras de 343 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 91,60% (Figura 33B).

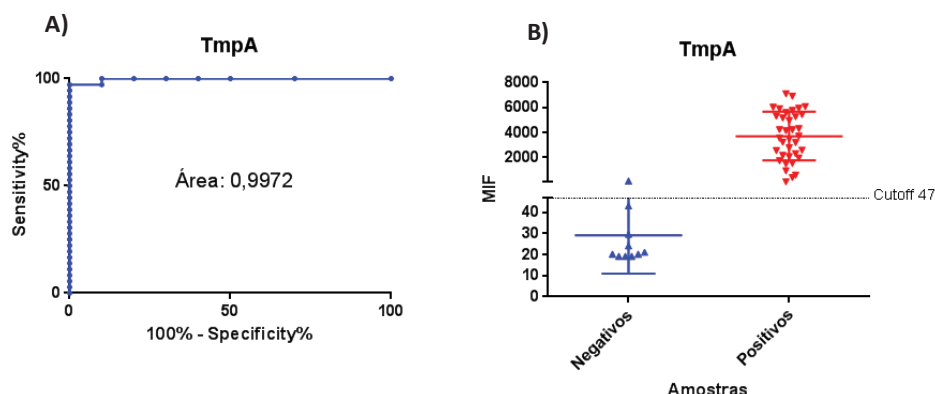
FIGURA 33: AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO II



Legenda: Testes sorológicos para TmpA com os soros do painel do grupo II. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,729; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=373 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Além dos testes sorológicos realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico do ICC, a proteínaTpN47 foi testada frente ao grupo III (detalhado na metodologia) de amostras no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – BioManguinhos. A curva ROC com área de 0,9972 (Figura 34A) mostra que a TmpA apresenta desempenho excelente para servir como antígeno por reconhecer todas as 36 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 9 das 10 amostras foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 90% (Figura34B).

FIGURA 34: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS COM A PROTEÍNA TMPA COM AMOSTRAS DO GRUPO III

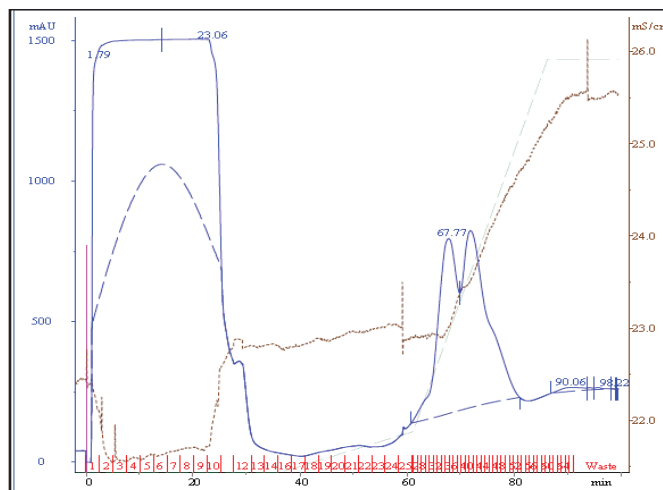


Legenda: Testes sorológicos para TmpA com os soros do painel do grupo III. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9972; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=46 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

6.11 Purificação da Lipoproteína de Membrana TpN15

Para a proteína recombinante TpN15 foram realizados testes de indução e expressão conforme descritos na metodologia para se determinar as melhores condições de expressão desta proteína. Diferente das TpN17, TpN47 e TmpA, para a proteína TpN15 as melhores condições encontradas foram temperatura de 37°C por 4 horas sob agitação de 200 rpm. Os processos de obtenção, preparo do extrato e purificação estão descritos detalhadamente na metodologia. Esta proteína foi sujeita até então apenas a um passo de purificação sendo a cromatografia de afinidade no sistema ÄKTA em coluna de resina de níquel de 5 ml.

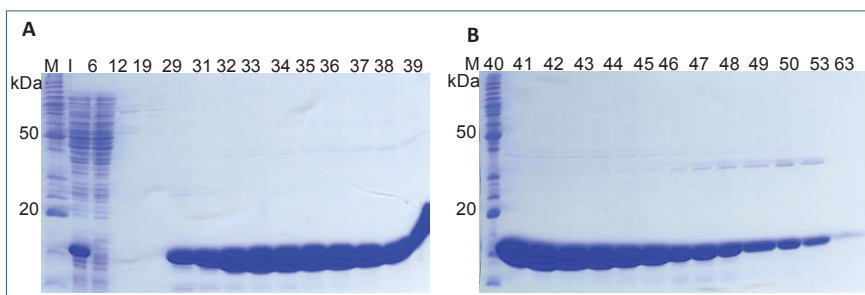
FIGURA 35: ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN15



Legenda: Perfil cromatográfico da purificação por afinidade da proteínaTpN15.

A (Figura 35) mostra o cromatograma correspondente à purificação por cromatografia líquida de afinidade, todas as frações das etapas de injeção de amostra, lavagem e eluição foram coletadas e alíquotas de cada fração foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% conforme figura 30 a fim de determinar a pureza da proteína obtida. O cromatograma desta proteína apresenta uma particularidade, com dois picos de eluição. As frações de 29 a 53 correspondentes a estes picos foram analisadas em gel de poliacrilamida. Elas apresentaram bandas do tamanho esperado para TpN15.

FIGURA 36: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DA PROTEÍNA TPN15



Legenda: Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie para análise da purificação. M: Marcador Bench Mark (Invitrogen), I: Extrato solúvel da proteína não purificado. As demais amostras correspondem às frações da purificação da TpN15 coletadas.

A (Figura 36) mostra o gel de poliacrilamida da purificação da TpN15 após a cromatografia de afinidade. A amostra 6 corresponde à fração não ligada à resina. As amostras 12 e 19 representam as frações de lavagem da coluna, as frações 29 e de 31 a 50 e 53 representam os dois picos de eluição da proteína e a fração 63 ao final da purificação.

6.12 Caracterização Estrutural da Proteína TpN15

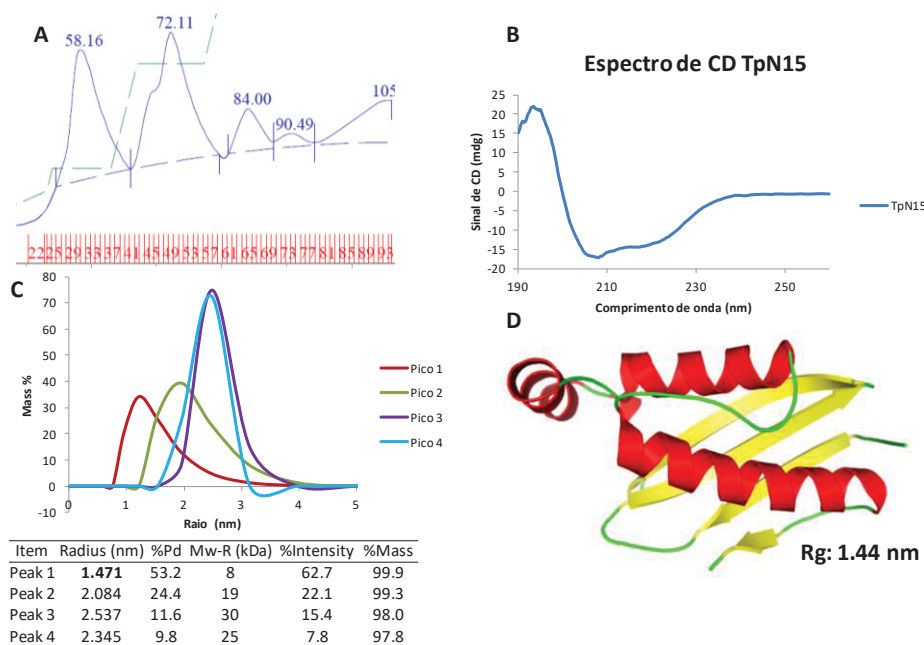
Como na primeira purificação da proteína TpN15 houveram dois picos de eluição, mas não separados totalmente, utilizando a função “hold” no processo de purificação a cada aumento de absorbância na purificação para melhor separar os dois picos, e nessa estratégia obtemos um perfil cromatográfico com quatro picos.

A presença de quatro picos no cromatograma da proteína TpN15 (Figura 37A) nos levou a investigar possíveis mecanismos que resultem em mudanças estruturais em solução. Uma análise da estrutura da TpN15 mostrou que ela apresenta enovelamento característico de proteínas da família flavina-mononucleotídeo (FMN). Os vários picos na cromatografia podem indicar diferentes conformações. Uma das explicações poderia ser uma forma apo e uma holo, com FMN ligado. Todavia não foi possível medir fluorescência associada a nenhum dos picos que poderia indicar a presença de FMN. As ortólogas mais parecidas com TpN15 que tem estrutura resolvidas são as proteínas (código do PDB: 3O6U_A) de Cpe2226 de *Clostridium perfringens* e A3dht5 de *Clostridium thermocellum* (código do PDB: 2KZX_A) que apresentam identidade de aminoácidos na faixa de 30%. Nenhuma das estruturas apresenta FMN ligado.

Para avaliar diferenças em nível de estrutura quaternária dos diferentes picos de eluição de Tpn15, realizamos um ensaio de DLS (Figura 37B) que indicou que o raio hidrodinâmico das moléculas em suspensão o primeiro pico corresponde ao monômero da proteína TpN15, já o segundo pico de eluição é composto de uma mistura de dímeros e monômeros. Já o terceiro e quarto picos da cromatografia possuem raio hidrodinâmico característicos do dímero da proteína TpN15. Então uma explicação alternativa para os quatro picos poderia ser diferentes estados de oligomerização da TpN15.

O espectro de CD (Figura 37 C) demonstra que a proteína TpN15 é rica em estrutura α -hélice com contribuição de estrutura fita- β que está de acordo com a modelagem estrutural teórica esta proteína possui estrutura secundária de acordo com estimado para ela.

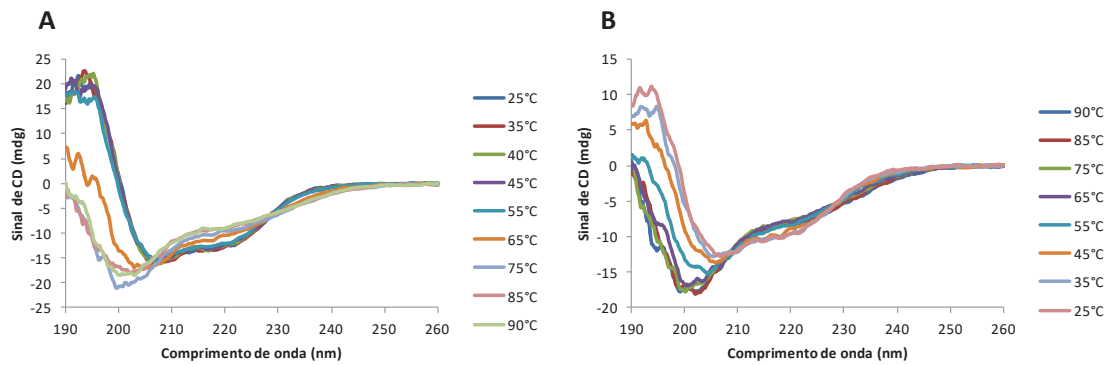
FIGURA 37: ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TPN15



Legenda: A) Cromatograma da purificação por afinidade proteína TpN15; B) Espectro de dicroísmo circular proteína TpN15; C) Dados de espalhamento dinâmico de luz proteína TpN15; D) Modelo de estrutura tridimensional da proteína TpN15.

A proteína TpN15 possui alta estabilidade térmica. Não houve perda de estrutura secundária até 55°C. Acima desta temperatura houve perda gradativa da estrutura secundária (Figura 38A). A TpN15 significativa capacidade de re-enovelamento após sofrer desnaturação (Figura 38B).

FIGURA 38: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA TPN15

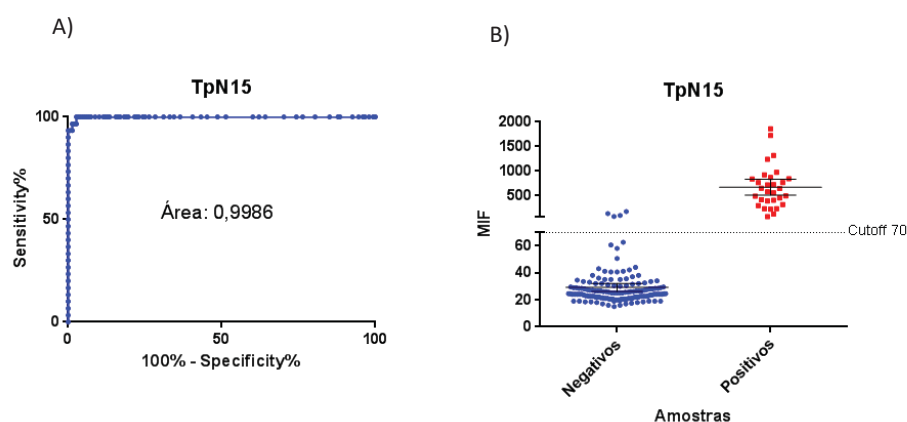


Legenda: Análise de estabilidade térmica por dicroísmo circular da proteína TpN15; A) Desnaturação; B) Renaturação.

6.13 Testes Sorológicos para a ProteínaTpN15

Para estudarmos a reatividade individual da proteína TpN15 recombinante utilizamos primeiramente os painéis do grupo I. A área da curva ROC de 0,9986 (Figura 39A) indica que a proteínaTpN15 apresenta muito bom desempenho como antígeno. Ela identificou todas as 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 151 amostras de 155 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 97,40% (Figura 39B).

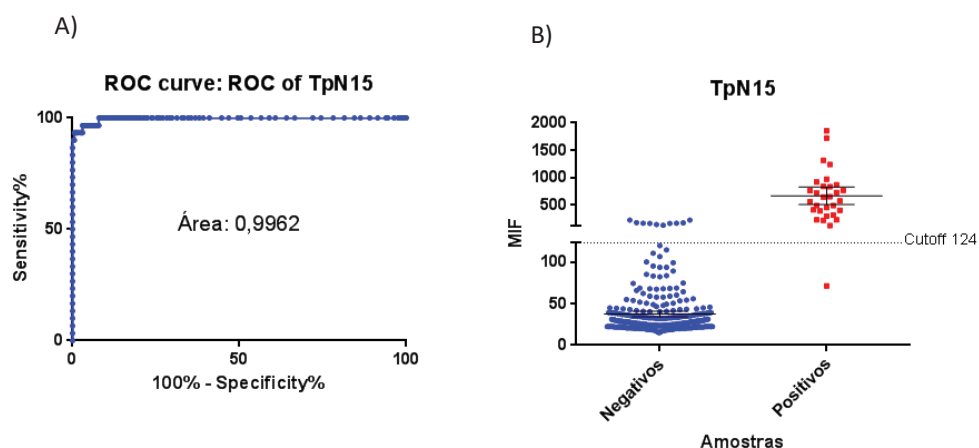
FIGURA 39: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO I



Legenda: Testes sorológicos para Tpn15 com os soros do painel do grupo I. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9995; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=185 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

A especificidade individual da proteína Tpn15 recombinante foi analisada também com os painéis do grupo II. A análise da curva ROC com área de 0,9986 (Figura 40A) mostra que a Tpn15 apresenta excelente desempenho como antígeno para estas amostras de soro. TmpA recombinante reconheceu 29 das 30 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 93,50%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 333 amostras de 343 foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 94,30% (Figura 40B).

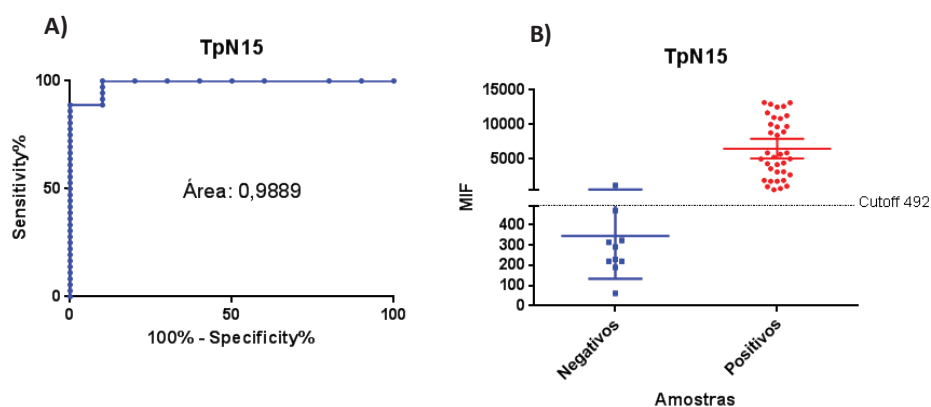
FIGURA 40: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO II



Legenda: Testes sorológicos para TPN15 com os soros do painel do grupo II. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9962; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=373 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

Além dos testes sorológicos realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico do ICC, a proteína TPN47 foi testada frente ao grupo III (detalhado na metodologia) de amostras no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – BioManguinhos. A análise da curva ROC com área de 0,9899 (Figura 41A) mostra que a TPN15 apresenta excelente desempenho para servir como antígeno. TPN15 recombinante reconheceu todas as 36 amostras verdadeiramente positivas como positivas, resultando em uma sensibilidade de 100%. Em relação às amostras verdadeiramente negativas, 9 das 10 amostras foram identificadas como negativas, resultando em uma especificidade de 90% (Figura 41B).

FIGURA 41: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNAS TPN15 COM AMOSTRAS DO GRUPO III



Legenda: Testes sorológicos para TPN15 com os soros do painel do grupo III. A) Gráfico da análise curva ROC com uma área de 0,9889; B) Gráfico Sensibilidade Xcutoff X Especificidade representando o valor de cutoff obtido através da curva ROC n=46 amostras negativas e positivas analisadas e sua relação com o cutoff obtido através da análise ROC mostrando o IC95%. MIF (Média de Imunofluorescência).

7. DISCUSSÃO

7.1 Potencial dos Antígenos Recombinantes para Diagnóstico de Sífilis

O *Treponema pallidum* não é cultivável *in vitro*, o que torna economicamente inviável a obtenção de antígenos treponêmicos de forma nativa. A detecção direta de *T. pallidum* fica condicionada às técnicas de microscopia como imunofluorescência e microscopia de campo escuro, que são técnicas de alto custo e extremamente laboriosas, assim a obtenção de antígenos treponêmicos para realização de ensaios sorológicos a partir de antígenos recombinantes torna-se uma alternativa importante para imunodiagnóstico de infecções com *T. pallidum*. Os testes como o VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e o RPR (Rapid Plasma Reagin), usados para detecção de sífilis baseiam-se na combinação de lecitina, colesterol e cardiolipina, consistindo em um antígeno não treponêmico. A interação das reaginas da amostra com este “antígeno” produz floculação que pode ser detectada ao microscópio óptico, entretanto este método não detecta a presença do treponema. Estes testes mostram sensibilidades médias de 86% e 78%, respectivamente, durante infecções em estágio primário e 73% e 71%, respectivamente, para as infecções em estágio final (Larsen et al., 1995; Seña, White, & Sparling, 2010). Além disso, os testes não treponêmicos podem apresentar reações cruzadas com uma variedade de doenças e condições de saúde, incluindo a varicela, artrite reumatóide, a gravidez e idade avançada (Larsen et al., 1995; Ratnam, 2005).

Além de anticorpos inespecíficos IgG e IgM anti-cardiolipina, na infecção por sífilis é possível detectar anticorpos específicos anti-treponêmicos. Os primeiros testes sorológicos treponêmicos usavam como antígeno treponemas da cepa Nichols formolizados ou lisados por ultrassom. O teste FTA-ABS (fluorescent treponemal antibody absorption). Apresentam rápida execução e baixo custo, mas necessitam de um microscópio de fluorescência. O TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Test) e o MHA-TP (Microhemagglutination assay-*T. Pallidum*) são testes baseados na hemoaglutinação passiva de eritrócitos sensibilizados de ovelhas. Os testes EIA (Enzyme Immunoassay), Western-blot e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) são confirmatórios e ambos identificam anticorpos contra imunodeterminantes IgM e IgG de massas moleculares (15 kDa, 17 kDa,

44,5 kDa e 47 kDa). Estes testes treponêmicos também têm sensibilidades baixas para a detecção de infecções precoces, com valores de 88% reportados para TPHA e 84% para o teste FTA-ABS, MHA-TP (Castro, Prieto, Santo, Azevedo, & Exposto, 2003; Ratnam, 2005; Seña et al., 2010).

O PCR é também útil no diagnóstico da sífilis adquirida, congênita e de neurosífilis. O DNA do *T. pallidum* é detectado por PCR com uso de oligonucleotídeos para o gene codificador de proteína com peso molecular de 47 kDa. A ampliação do RNA do *T. pallidum* é mais sensível por demonstrar a viabilidade do treponema, e utiliza oligonucleotídeos que amplificam uma região com 366 pares de bases do rRNA de 16S (Castro, et al., 2003; Rotta, 2005).

Ultimamente, os testes imunocromatográficos “point-of-care” (ponto-de-atendimento), EIA, ELISA foram desenvolvidos objetivando o diagnóstico rápido de sífilis. Estes ensaios, que utilizam uma ou mais proteínas treponêmicas recombinantes, têm recebido significativo interesse no campo do diagnóstico da sífilis devido à sua reprodutibilidade, objetividade e potencial para automação (Hoover & Radolf, 2011). Antígenos recombinantes específicos permitem melhorar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes sorológicos.

A escolha dos antígenos deste estudo baseou-se principalmente em trabalhos que detalhavam a resposta imunológica em sífilis experimental (Byrne et al., 1992; Hanff, Fehniger, Miller, & Lovett, 1982; Lewis & Young, 2006; Radolf & Lukehart, 2006; Sánchez et al., 1989; Sánchez, Wendel, & Norgard, 1992), em testes sorológicos comerciais que utilizam proteínas recombinantes (Wama-Diagnóstica Teste Rápido; Trep-Chek IgG EIA – Phoenix Bio-TechCorp; Enzygnost Syphilis – Dade Behring; Syphilis TP – Abbott; INNO-LIA Syphilis) e em estudos de ensaios sorológicos com proteínas recombinantes (Hoover & Radolf, 2011; Sambri et al., 2001; N S Sato et al., 1999, 2004; Sato & Takeda, 1996; Young et al., 1998). As principais proteínas de *T. pallidum* relatadas são TpN17 (Tp0435), TpN47 (Tp0574), TpN44,5 (Tp0768, TmpA) e TpN15 (Tp0171) que são caracterizados como lipoproteínas de membrana (Akins, et al., 1993; Purcell et al., 1989; Sato & Takeda, 1996; Weigel et al., 1992).

7.2 Vantagens do Sistema de Expressão de Proteínas Recombinantes em *E. coli*

As principais vantagens em se utilizar o sistema bacteriano de expressão são: níveis de expressão bem altos, baixo custo, condições de cultura simples, crescimento rápido, escalonável, protocolos simples e vários parâmetros podem ser alterados para melhorar a expressão. A linhagem celular utilizada neste trabalho *E.coli* BL21(DE3)-Star é amplamente utilizada na obtenção de antígenos recombinantes (Jana & Deb, 2005; Kane, 1995), sendo que a maior parte das proteínas cujas estruturas tridimensionais estão depositadas no PDB (Protein Data Bank) foi obtida neste modelo de expressão (Sørensen & Mortensen, 2005). A escolha do plasmídeo pET28 para expressão baseou-se na facilidade de clonagem dos genes de interesse com poli-histidina tanto N- como C-terminal e na presença do gene *lacI* que permite maior inibição da transcrição basal na ausência do indutor IPTG. Neste trabalho, as proteínas expressas a partir deste vetor possuem uma hexa-histidina no N-terminal que permite sua purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, tanto em condições nativas quanto desnaturantes.

O rendimento das proteínas recombinantes expressas neste trabalho foi na casa da dezena de miligramas por litro de cultura. No geral a massa celular após o período de indução das quatro proteínas manteve-se na mesma média de 18-20 g em 2 litros de cultura. O rendimento após a purificação foi de aproximadamente 10 mg/L de indução, com exceção da proteína TpN15 cujo rendimento foi maior, de aproximadamente 14 mg/L de cultura.

Os protocolos de expressão em *E. coli* BL21(DE3)-Star e purificação usados neste trabalho mostraram ser eficientes, uma vez que permitiram a produção das proteínas recombinantes em quantidade suficiente para ensaios imunológicos e de estabilidade estrutural. A purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica das proteínas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 padronizada neste estudo pode ser usada nas futuras etapas de escalonamento e produção dos antígenos recombinantes.

7.3 Vantagens em se Usar Genes Sintéticos

A sequência gênica de interesse nos organismos de origem pode conter códons que não são muito utilizados por *E. coli* (Wada et al., 1992). O grau de frequência destes códons pode diminuir, podendo não haver expressão da proteína heteróloga. Os mesmos devem ser substituídos pelos códons sinônimos mais utilizados pela bactéria (índice de adaptação

de códons, ou do inglês “códon adaptation index, CAI”) (Makrides, 1996). Sequências gênicas podem ser analisadas e melhoradas através de “softwares” disponíveis em sítios na rede internacional de informática (Sharp & Li, 1987). Os genes podem ser sintetizados no próprio laboratório ou adquiridos de empresas de biotecnologia sintetizam DNA com a taxa códons ideal para várias células hospedeiras de expressão.

7.4 Métodos de Purificação Adotados

A cromatografia de afinidade é muito utilizada apesar de ter o custo mais elevado, ela é altamente específica levando a um alto fator de purificação. O exemplo clássico deste tipo de cromatografia é a afinidade por metal níquel quelante usado para separar proteínas com cauda de histidina (Asenjo & Andrews, 2008). A cromatografia de troca iônica é uma das mais utilizadas por ser de baixo custo e de fácil operação, ela baseia-se em interações eletrostáticas como princípios de separação.

A produção de grandes quantidades de proteína, na base de miligramas para estudos estruturais e funcionais, requer uma eficiente purificação (DONNELLY *et al.*, 2006). Normalmente, a purificação de proteínas é facilitada por adição de caudas de fusão, o que permite a purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos, e como já dito anteriormente as proteínas recombinantes produzidas neste trabalho (TpN17, TpN47, TmpA e TpN15) foram clonadas em pET-28 (Novagen), que é um vetor que insere uma cauda de 6 histidinas na porção N-terminal das proteínas que permite a purificação destas proteínas em uma única etapa de cromatografia de afinidade ao metal níquel (Ni^{+2}) como ocorrido com a proteína TpN15 (Figura 36).

As tentativas de purificação das proteínas usadas neste trabalho foram bem sucedidas já desde os testes de mini expressão e reproduzidas com sucesso na escala de 2 litros no sistema de cromatografia ÄKTA. O fato de se tratarem de proteínas solúveis com correta fusão N-terminal à cauda de hexa-histidinas permitiu rápida e eficiente padronização do métodos de purificação.

Podemos observar pela análise em SDS-PAGE das frações da purificação por afinidade que apenas a proteína TpN15 apresentou o grau de pureza desejado apenas com a purificação por afinidade, assim, dispensando uma segunda etapa cromatográfica o que

explica o fato do rendimento desta proteína ser superior as demais, visto que não houve perda por agregação e/ou precipitação na troca de tampão necessária a etapa seguinte de purificação seja por troca iônica ou interação hidrofóbica. Para as demais proteínas TpN17, TpN47 e TmpA houve a necessidade de um novo passo cromatográfico.

Para se determinar o ponto isoelétrico teórico de cada proteína, a sequência aminoacídica foi analisada pelo *Expasy-Resource Bioinformatics Portal* (disponível no site: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>). Com base no pI teórico de cada proteína escolhemos a resina e o tampão da etapa cromatográfica subsequente de purificação. Para a proteína TpN17 com base no pI teórico de 8,73 escolhemos a resina de troca catiônica SP em um tampão de fosfato de pH 6,8 com eluição por gradiente de NaCl. Este procedimento mostrou-se eficiente adequado a purificação visto o grau de pureza e rendimento obtidos (Figura 9). Para as proteínas TpN47 e TmpA com pI de 5,25 e 5,17 respectivamente, escolhemos a resina Q-Sepharose num tampão fosfato de pH 7,4 para a purificação por troca aniônica com eluição por gradiente de NaCl. Ambas as proteínas apresentaram alto grau de pureza (Figura 20) para TpN47 e (Figura 29) para TmpA.

O sistema de expressão bacteriano e as etapas de purificação adotados neste estudo permitem fornecer uma fonte constante, reprodutível e escalonável de antígenos para diagnóstico de sífilis.

7.5 Caracterização Estrutural

A estabilidade proteolítica foi analisada em gel de poliacrilamida após cada etapa de purificação e o uso de inibidores de protease ao final de cada etapa de purificação foi determinante para controle de degradação.

A influência de solutos sobre o equilíbrio de estabilização de proteínas é um processo corrente nos organismos vivos. A complexidade do ambiente *in vivo* das proteínas exige uma análise detalhada *in vitro* de cada uma das diferentes condições ambientais naturais, para possibilitar maior compreensão dos mecanismos de ação dos diferentes agentes naturais capazes de perturbar o equilíbrio entre os estados nativo e desnaturados da proteínas. Os estudos *in vitro* também podem permitir a simulação de uma variedade de situações capazes

de alterar o equilíbrio de estabilização de uma proteína, dando suporte crescente para sua utilização biotecnológica.

Os determinantes antigênicos ou epítomos podem ser: conformacionais (descontínuos) e ou lineares (contínuos). Os epítomos conformacionais são estruturas reconhecidas compostas por segmentos proteicos descontínuos na sequência de aminoácidos do antígeno, mas contínuos na estrutura tridimensional. O epítomos lineares são compostos por fragmentos únicos da cadeia polipeptídica, podem ser acessíveis aos anticorpos em uma proteína nativa dobrada, mas frequentemente, os determinantes lineares podem ser inacessíveis na conformação nativa e surgir apenas quando a proteína é desnaturada (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012).

O calor, por si só, é um agente caotrópico, pois aumenta a entropia vibracional dos grupamentos da proteína, o que favorece a ruptura das ligações não covalentes que estabilizam o estado nativo, promovendo sua desnaturação. A quebra de ligações decorrente do aumento da vibração de grupos.

As análises estruturais por dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz realizadas nas proteínas recombinantes visam avaliar a estabilidade química e física das proteínas purificadas, levando em conta o subsequente armazenamento, transporte, ensaio sorológico, durabilidade e reprodutibilidade dos processos. Assim, na purificação de cada lote de proteínas espera-se obter sempre os mesmos perfis cromatográficos, padrão de bandas em gel de eletroforese, bem como mesmo perfil de estrutura secundária e quaternária. O fato de proteínas tornarem-se instáveis em determinadas condições de tampões ou temperatura interfere diretamente na reprodutibilidade para produção destes antígenos em aumento de escala. Porque, quando uma proteína precipita e agrega ocorre perda indesejável de material, que na maioria das vezes não pode ser recuperado. A avaliação de estabilidade térmica sempre visa o armazenamento, transporte e ensaios sorológicos de um conjunto de antígenos. Se um antígeno só se mantém estável em ambiente refrigerado, torna-se inviável para compor um kit de diagnóstico, além disso, variações químicas também influenciam na estabilidade de proteínas. Uma proteína com estrutura instável sofre facilmente agregação, uma proteína desnaturada expõe mais sítios proteolíticos a proteases indesejáveis. Com base nisso realizamos análises de CD e DLS em todas as proteínas após a purificação.

Para a proteína TpN17 ao realizar uma triagem para encontrar a melhor condição para armazenamento, suspeitou-se que a concentração interferia na dispersividade. Assim, para

investigar estas transições estruturais ela foi analisada em diferentes concentrações por dicroísmo circular em 50 mM de tampão de fosfato com pH 7,4. Em concentrações inferiores a 0,2 mg/mL, Tpn17 adota a conformação da proteína desenovelada, enquanto que a uma concentração de 0,3 mg/mL de proteínas estão presentes estruturas β - α e surpreendentemente e em concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/mL assume uma conformação rica em estruturas- β (Figura 10A).

Para avaliar a estrutura quaternária em relação à concentração de proteína, realizamos análises de espalhamento dinâmico de luz nas concentrações de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL de Tpn17 (figura 11 A). O raio de giro (R_g) do monômero de Tpn17 ($\sim 1,7$ nm) e o dímero ($\sim 2,3$ nm) foi calculado pelo programa Crysol (SVERGUN, D. et al 1995) usando modelo estrutural de Tpn17 gerado por homologia (Figura 11 B). Como esperado, o R_g (raio de giro) é menor do que R_h (raio hidrodinâmico) uma vez que não incluem a camada de solvatação. Estes resultados indicam que Tpn17 pode dimerizar de acordo com a concentração. A dimerização é, no entanto, antes da transição estrutural da proteína (Figura 11 A). Esta hipótese baseia-se no fato de que tanto em 0,2 com em 0,3 mg/mL Tpn17 está mais desenovelada, mas apenas valor R_h de 0,3 mg/mL de Tpn17 está de acordo com o de um dímero. Além disso, a redução de polidispersividade mediante aumento da concentração corrobora esta hipótese. Tpn17 nas concentrações de 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL é provavelmente dimérica (Figura 11 A). No entanto, em 0,3 mg/mL a polidispersividade é maior do que em 0,4 e 0,5 mg/mL. Isto indica que nesta concentração uma mistura de proteína monomérica e dimérica pode ser encontrada.

A interface dimérica de Tpn17 resulta na estabilização da proteína que confere termoestabilidade e resistência à clivagem proteolítica. A análise do transcriptoma indica que, no momento da infecção, Tpn17 é altamente expressa (SMAJS, D. et al, 2005). É provável que na infecção, a oligomerização de Tpn17 é favorecida por causa da quantidade de proteína disponível. Nesta situação, é de se esperar que as proteínas altamente resistentes possuem um papel importante na patogênese.

O padrão de proteólise por tripsina de Tpn17 difere dependendo da concentração de proteína (Figura 12A) coerentemente com os espectros de CD que indicam o desdobramento de Tpn17 na concentração abaixo de 0,2 mg/mL (Figura 11 A). O desdobramento expõe os sítios proteolíticos e explica os resultados encontrados no ensaio de proteólise. Por outro lado, na concentração de 0,5 mg/mL, o dímero de Tpn17 rico em fitas β protege sítios proteolíticos da degradação. Todos estes dados, indicam claramente o enovelamento da Tpn17 dependente da concentração de proteína. O alinhamento de sequências com

estruturas resolvidas revelam que Tpn17 tem um enovelamento estrutural semelhante de NlpE de *E. Coli* (Np_718719.1, PDBID: 3LHN, (Svergun, Barberato, & Koch, 1995). NlpE ativa a via Cpx. Esta via é ativada por uma variedade de estresses, tais como a alteração no pH extracelular, defeitos na membrana interna, e alta osmolaridade extracelular (Hirano et al., 2007; Ruiz & Silhavy, 2005). A ativação da via Cpx induz expressão das proteínas periplasmáticas incluindo a DsbA (dissulfeto oxidase) as peptidil-isomerases PPIA e PPID (PPIases) e a chaperonina da protease DegP (Dartigalongue & Raina, 1998; Hirano et al., 2007; Ruiz & Silhavy, 2005). O alinhamento de sequências revelam que *T. pallidum* não tem dissulfeto oxidase homóloga a DsbA nem a peptidil-isomerases PPID. Contudo, conserva a peptidil-prolil-isomerase PPIA (gi 341919753) e a chaperonina da protease DegP (gi 359331020). (Bardwell et al., 1991; Pogliano et al., 1997). A ausência de um dissulfeto oxidase homóloga à DsbA é interessante porque Tpn17 não conserva os resíduos de cisteína como os regulados em NlpE. Todavia, Tpn17 pode ter um papel funcional relacionado com NlpE e outros reguladores de oxidases. A ativação da via Cpx pode ser regulada por desdobramento/enrolamento incorreto de proteínas ativadoras (Hirano et al., 2007; Nakamoto & Bardwell, 2004).

A semelhança estrutural da Tpn17 com a NlpE, um ativador da via Cpx indica que a alternância conformacional de Tpn17 pode ser um mecanismo para regular uma cascata similar em *T. pallidum*. A estabilidade térmica e proteolítica indicam que Tpn17 em concentração superior a 0,4 mg/ml é muito estável para que possa funcionar como um detector de situações de estresse. Em menor concentração, proteína o desdobramento poderia funcionar como para NlpE (Hirano et al., 2007) e PapE (Y. S. Kim et al., 2009; Remaut & Waksman, 2006) que, quando parcialmente desenoveladas sinalizam para outras proteínas ativarem Cpx.

As análises estruturais realizadas com a proteína Tpn47 indicaram que a proteína expressa neste estudo possui estrutura secundária e quaternária condizente com a estrutura cristalográfica (PDB:1075; DEKA et al., 2002). Tpn47 é uma proteína ligante de penicilina rica em estrutura alfa e beta conforme observado no espectro de CD (Figura 21A). Relacionando raio hidrodinâmico de 3,563 nm e a massa estimada de 66 kDa observados na análise de DLS (Figura 21C) com a estrutura cristalográfica concluímos que a proteína Tpn47 é dimérica (Figura 21B) visto que, tanto massa estimada quanto raio de giro são indicativos de um estado dimérico para Tpn47. O raio de giro estimado de um monômero de Tpn47 é de 1,54 nm e a massa de 47 kDa, entretanto nas medidas obtidas por DLS observamos que o raio hidrodinâmico e a massa são compatíveis com o dímero de Tpn47.

A análise da estabilidade térmica para TpN47 avaliada por dicroísmo circular revelou na perda gradativa de conteúdo de estrutura secundária a partir de 35°C com desnaturação completa acima de 60°C (Figura 22A). A se fazer a renaturação da TpN47, os espectros de CD obtidos (Figura 22B) demonstraram a incapacidade de renaturação desta proteína. Entretanto em condições “reais” de armazenamento de antígenos refrigerados ou temperatura ambiente a proteína TpN47 possui boa estabilidade térmica.

A análise de estabilidade térmica para a proteína TmpA revelou através dos espectros de CD que ocorre uma perda gradativa de estrutura secundária acima de 35°C com desnaturação completa em temperaturas acima de 60°C. O re-enovelamento da TmpA foi observado a medida que a temperatura foi diminuída, entretanto o espectro de CD observado não é idêntico ao da proteína nativa. Mesmo assim esta análise indica a alta estabilidade térmica da proteína TmpA.

A presença de mais de um pico no cromatograma de eluição da proteína TpN15 (Figura 35) nos levou a investigar sua possível origem. Uma análise dos domínios conservados revelou a presença de um domínio “FMN” na proteína TpN15. Este domínio é característico de proteína que ligam Flavina Mononucleotídeo (FMN). A possibilidade da TpN15 estar em duas conformações apo e halo, sendo uma delas com FMN ligado não foi demonstrada experimentalmente. Na análise de DLS observou-se variação no raio hidrodinâmico (Figura 37B), confirmando que a proteína TpN15 apresenta-se em diferentes estados oligoméricos, mas não relacionados ao ligante FMN. O espectro de CD mostra que TpN15 é rica em estrutura alfa com contribuição de beta (Figura 37D), este resultado é condizente com o modelo teórico da TpN15 (Figura 37D).

O papel da dimerização ainda não é bem elucidado devido à escassez de dados biofísicos sobre esse assunto, sendo as enzimas a classe de proteínas mais bem caracterizadas nesse sentido (MARIANAYAGAM *et al.*, 2004). A hemoglobina com certeza é o caso mais conhecido de auto associação de monômeros. A dimerização ou oligomerização de proteínas é um fenômeno comum e muitas vezes promove maior estabilidade e aumento de atividade enzimática pela concentração do sitio ativo das proteínas, porém, este mesmo processo pode levar a sua inativação (Marianayagam, Sunde, & Matthews, 2004).

A maioria das enzimas se apresenta na forma de homo oligômeros e o mesmo é observado levando em consideração somente às enzimas humanas. Já foi reportado que esses processos de dimerização e oligomerização são o fator chave para mediação e

regulação da expressão de genes, atividade de enzimas, canais de íons, receptores e processos de adesão celular (Hashimoto et al., 2011; Marianayagam et al., 2004).

A proteína TpN15 possui alta estabilidade térmica, não houve perda de estrutura secundária até 55°C (Figura 38A) e ainda demonstrou alta capacidade de re-enovelamento a medida que a temperatura da solução foi diminuída (Figura 38B).

Nos testes de acoplamento dos antígenos às microesferas verificamos que a troca de tampão não influenciava na reatividade dos imunoensaios, assim optou-se por prosseguir os testes imunológicos sem a troca de tampão. Entretanto a análise oligomérica e a estabilidade térmica são fundamentais para definir as melhores condições de armazenamento, bem como a adição de agentes químicos com objetivo de promover a estabilidade química de proteínas *in vitro*.

Em condições fisiológicas o estado nativo corresponde à conformação termodinamicamente mais estável. Quando sujeitas a alterações de temperatura, pH, ou na presença de agentes químicos desnaturantes, as proteínas podem, facilmente, perder a conformação nativa e desnaturar. O processo de desnaturação pode ser avaliado por diversos métodos biofísicos. A estabilidade do estado nativo de uma proteína tem particular importância quando esta tem aplicação na medicina ou na indústria. Um fato importante é o de o estado nativo ser apenas ligeiramente mais estável que o estado desnaturado.

7.6 Desempenho dos Antígenos nos Testes Sorológicos

O diagnóstico definitivo da infecção por sífilis é realizado geralmente pela detecção de anticorpos anti-treponêmicos no soro humano. A possibilidade de um resultado falso negativo tanto em laboratórios clínicos quanto em serviços de hemoterapia representa um sério e grave risco sanitário. Levando em consideração o grande número de conjuntos diagnósticos disponíveis para detecção de anti-treponema, torna-se essencial avaliar estes antígenos frente a painéis sorológicos validados utilizados como controle de qualidade antes da liberação de antígenos para o mercado nacional.

As amostras sorológicas testadas neste estudo são divididas em três grupos, o primeiro grupo de amostras do programa AEQ-agente externo de qualidade da ANVISA, o segundo grupo com amostras do grupo I e amostras do painel internacional (PI) Sera Care. O grupo III é composto de amostras AEQ, INCQS, IPEC. Com exceção dos painéis PI os

demais painéis, são compostos de amostras controles positivo para sífilis, HIV, HTLV, hepatites virais e doença de Chagas. A variedade de doenças dos painéis testados está condicionada à regulamentação da triagem de bolsas de sangue e triagens sorológicas na rede materno-infantil, sistemas para os quais se destinam os antígenos desenvolvidos neste trabalho. Esta variedade de patógenos explicada pela necessidade de não haver reações cruzadas com amostras que compõem o mesmo sistema de triagem.

Nos ensaios sorológicos para TpN17 com os painéis do grupo I obtivemos uma área de curva de ROC de 0,9995 (Figura 14A). A mesma área também foi obtida com o grupo II (gráfico 11 A). Este valor de área indica o desempenho máximo para o antígeno TpN17 com base no *cutoff* de 1000 MIF (medida de imunofluorescência) aplicado a esta análise. A sensibilidade do antígeno TpN17 testado com os painéis do Grupo I (Figura 14B) e também com o grupo II (Figura 15B) foi de 100%, estes resultados demonstram a sensibilidade máxima para um antígeno que destina-se a testes de triagem. A especificidade observada nos testes com os soros do grupo I (Figura 14B) foi de 98,70%. Quando ampliamos para o grupo II houve um sensível aumento na especificidade para 98,80% (Figura 15B), demonstrando a capacidade reativa deste antígeno em separar amostras positivas e negativas com valores de MIF bem distintos. Nos ensaios sorológicos realizados no grupo III para a proteína TpN17 a análise da área da curva ROC igual a 1 (Figura 16A) indica máxima relação entre sensibilidade e especificidade. Tanto a sensibilidade quanto a especificidade para estes ensaios foram de 100% (Figura 16B). Estas análises indicam que o antígeno TpN17 possui excelente sensibilidade e especificidade, para utilização em teste de triagem para sífilis.

Nos ensaios sorológicos com a proteína recombinante TpN47 obtivemos uma área de curva ROC de 0,9995 (Figura 23A) para análises com painéis grupo I e uma área de curva ROC de 0,9988 (Figura 24A) painéis de amostras do grupo II. Este valor de área indica uma ótima relação entre a sensibilidade e especificidade para o antígeno TpN47 com base no *cutoff* de 95 MIF aplicado a esta análise. A sensibilidade do antígeno TpN47 testado com os painéis do grupo I foi de 100%, que corresponde à máxima sensibilidade para um antígeno que destina-se a testes de triagem. A especificidade observada nos testes com painéis do grupo I foi de 97,50% (Figura 23B). Quando ampliamos a análise a fim de aumentarmos o número de possíveis falso-negativos incluindo grupo II houve o aumento na especificidade para 97,70% (Figura 24B). Nos ensaios sorológicos com painéis de amostras do grupo II, assim como a TpN17, para os ensaios com a TpN47 a área da curva ROC foi de 1 (Figura 25A) com sensibilidade e especificidade de 100% (Figura 25B) num *cutoff* de 142 MIF. Estas

análises indicam que o antígeno TpN47 possui sensibilidade e especificidade ideais para testes de triagem sorológica para sífilis.

Nos ensaios sorológicos para TmpA obtivemos uma área de curva de ROC de 0,9896 (Figura 32A) para análises com painéis do grupo I e uma área de curva ROC de 0,9729 (Figura 33A) quando acrescentamos os painéis do grupo II. Este valor de área indica um bom desempenho entre a sensibilidade e especificidade para o antígeno TmpA com base no cutoff de 140 MIF aplicado a esta análise.

Em relação aos imunoensaios, a sensibilidade do antígeno TmpA testado com os painéis tanto do grupo I quanto do grupo II foi de 76,5%. A especificidade observada nos testes com painéis grupo I foi de 97,50%, quando ampliamos a análise com o grupo II houve a redução na especificidade para 91,60%, demonstrando que a reatividade deste antígeno possui número de MIF muito próximos entre as amostras positivas e negativas, estas análises indicam que o antígeno TmpA obteve baixa sensibilidade, mas uma boa especificidade nestes experimentos. Nos ensaios sorológicos do grupo III, a área da curva ROC obtida num cutoff de 47 MIF foi de 0,9972 e demonstra desempenho excelente para servir como antígeno. A sensibilidade obtida nas análises deste grupo foi de 100% e uma especificidade de 90%.

Há uma discrepância entre a sensibilidade nos ensaios do grupo I e grupo II, e grupo III este fato se deve provavelmente a características próprias das amostras, em relação a concentração de anticorpos anti-TmpA em cada amostra. Os resultados demonstram baixa sensibilidade para um antígeno que destina-se a testes de triagem. Em média os testes de triagem diagnóstica como VDRL e RPR possuem sensibilidade mínima de 80% no caso de pacientes em estágio primário da sífilis, entretanto os resultados do grupo III demonstraram sensibilidade superior, confirmando assim o alto potencial de TmpA para aplicação em imunodiagnóstico.

Nos ensaios sorológicos com a proteína TpN15 recombinante obtivemos uma área de curva ROC de 0,9986 para as análises sorológicas com os painéis do grupo I (Figura 39A) e uma área de curva ROC de 0,9962 (Figura 40A) quando a painéis do grupo II. Estes valores de área indicam que TpN15 obteve um excelente desempenho em relação a sensibilidade e especificidade como antígeno com base no cutoff aplicado a cada análise.

Em relação aos imunoensaios, a sensibilidade do antígeno TpN15 testado com os painéis do grupo I foi de 100% (Figura 39B) e, acrescentando-se os painéis do grupo II foi de 93,5% (Figura 40B). Estes resultados demonstram alta sensibilidade para um antígeno que destina-se a testes de triagem, entretanto a variação em relação ao número de amostras

e indica que o número de MFI deste antígeno relacionado as amostras negativas é bastante próximo, mesmo assim a sensibilidade obtida para este antígeno é adequada a testes de triagem sorológica para sífilis. A especificidade observada nos testes com o grupo I foi de 97,40% (Figura 39B), quando ampliamos a análise com adição dos painéis do grupo II houve a redução na especificidade para 94,30% (Figura 40B), demonstrando que a reatividade deste antígeno possui número de MIF próximos entre as amostras positivas e negativas. Com os ensaios sorológicos das amostras do grupo III obtivemos uma área de curva ROC de 0,9889 (Figura 40A) para TpN15 que indica excelente desempenho como antígeno. A sensibilidade observada para este grupo foi de 100% e a especificidade de 90% (Figura 40B). O conjunto de análises grupos I, II e III indicam que o antígeno TpN15 possui alta sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizado em conjunto com os demais antígenos para que obtenha-se um excelente teste de triagem sorológica para sífilis.

Do ponto de vista de um Kit de diagnóstico a sensibilidade e especificidade global do kit é que são determinantes, portanto a avaliação de desempenho individual de cada antígeno é importante com base na decisão de quais antígenos serão incorporados ao kit de diagnóstico.

TABELA 1: MÉDIA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES TESTADOS COM AMOSTRAS DOS PAINÉIS SOROLÓGICOS DOS GRUPOS I E II.

Antígeno	Sensibilidade	Especificidade
TpN17	100%	99,16%
TpN47	100%	98,40%
TmpA	84,33%	93,03%
TpN15	97,33%	93%
Média	95,54%	95,89%

Fonte: O autor

Na Tabela 2 temos a média geral de sensibilidade e especificidade por antígeno, levando-se em conta os dois grupos de soros testado, comparando a kits comerciais temos: Trep-Chek IgG EIA – Phoenix Bio-Tech Corp com sensibilidade de 85,3 % e especificidade de 95,6% (TSANG, MARTIN, LAU, & SAWATZKY, 2007); Enzygnost Syphilis – Dade Behring com Sensibilidade de 97,3% e especificidade de 99,50%; Syphilis TP –Abbott com sensibilidade de 100% e especificidade de 99% (KIM et al., 2008); INNO-LIA Syphilis com sensibilidade de 100% e especificidade de 99,30%(HAGEDORN et al., 2002) e Imuno-Rapid Sífilis – Wama diagnostica com sensibilidade de 100% e especificidade de 99,1%.

Estudos com os antígenos TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 recombinantes são constantes na literatura em especial na China, devido ao alto rendimento, solubilidade e reprodutibilidade, construções únicas e quimeras são amplamente exploradas. A sensibilidade e especificidade obtida nos ensaios imunológicos realizados neste estudo corroboram a eficiência destes antígenos na aplicação de imunodiagnóstico específico para sífilis.

Um ensaio de ELISA com a fusão por PCR das proteínas recombinantes TpN17, TpN15 e TpN47 obteve uma sensibilidade de 99,5%, superior a sensibilidade individual de cada proteína no mesmo estudo (SUN, MAO, HU, SUN, & YAN, 2009). Um estudo realizado na China com 1209 pacientes tratados após um ano e entre esses 100 com sorologia positiva confirmada para sífilis usando como método a imunocromatografia com os antígenos recombinantes TpN17 e TpN47 obteve sensibilidade de 98,21 e especificidade de 99,04% para TpN17 e 93,75% de sensibilidade e 99,73% de especificidade para TpN47 (PARK *et al.*, 2011). A avaliação por ELISA da proteína de fusão TpN17-TpN47 demonstrou uma reatividade de 98,6% para a proteína fusionada em comparação a TpN17 e TpN47 83,8% e 83,3% respectivamente (SUN *et al.*, 2009). Um estudo comparativo com proteínas purificadas a partir do extrato total de *T. pallidum* em relação às proteínas recombinantes expressas em *E. coli* revelou maior sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes (SAMBRI *et al.*, 2001).

A sensibilidade e especificidade das proteínas produzidas neste estudo confirmam seu potencial para aplicação em testes diagnósticos mesmo quando comparadas aos kits comerciais em uso e com estudos de referência, este fato demonstra o potencial dos antígenos aqui produzidos para incorporar kits produzidos no Brasil.

8. CONCLUSÃO

- As proteínas antigênicas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 selecionadas para este estudo foram obtidas na fração solúvel com alto grau de pureza e rendimento, tendo todo seu processo de produção já padronizados.

- Os resultados para os ensaios de espectroscopia para as proteínas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 demonstram que estas proteínas foram obtidas corretamente estruturadas e não formam agregados em solução.

A estabilidade térmica das proteínas TpN17, TpN47, TmpA e TpN15 avaliada pelo método de CD mostrou que o conteúdo de estrutura secundária permanece estável em temperatura ambiente. Isto é importante porque o acoplamento dos antígenos às microesferas, no sistema Luminex, é feito nesta condição.

- Os ensaios sorológicos demonstram alta sensibilidade e especificidade para os antígenos TpN17, TpN47, TmpA e TpN15. Evidenciando o potencial para compor kits de imunodiagnóstico para Sífilis.

9. BIBLIOGRAFIA

Akins, D. R., Purcell, B. K., Mitra, M. M., Norgard, M. V, & Radolf, J. D. (1993). Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infection and Immunity*, 61(4),1202–10.Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2008). Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *Journal of Molecular Recognition : JMR*, 22(2), 65–76. doi:10.1002/jmr.898

Avelleira, J. C. R., & Bottino, G. (2006). Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(2), 111–126. doi:10.1590/S0365-0596006000200002

Bardwell, J. C., McGovern, K., & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, 67(3), 581–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1934062>

Binnicker, M. J., Yao, J. D., & Cockerill, F. R. (2011). Non-treponemal serologic tests: a supplemental, not confirmatory testing approach. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(2), 274–5; author reply 275–6. doi:10.1093/cid/ciq127

Brasil. (2010). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes: manual de bolso/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em. Retrieved from http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consenso_gestantes_2010_vf.pdf

Brasil, M. da S.-S. de V. em S. (2012). Boletim Epidemiológico de Sífilis 2012 | Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Retrieved September 25, 2014, from <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2012>

Byrne, R. E., Laska, S., Bell, M., Larson, D., Phillips, J., & Todd, J. (1992). Evaluation of a *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 115–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=265005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Castro, R. (2004). Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. IHMT. Retrieved from <http://run.unl.pt/handle/10362/10356>

Castro, R., Prieto, E. S., Santo, I., Azevedo, J., & Exposto, F. da L. (2003). Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 250–3. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=149557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

CDC, S. S. (2012). 2012 STD Surveillance | CDC. Retrieved July 16, 2014, from <http://www.cdc.gov/std/stats12/default.htm>

Dartigalongue, C., & Raina, S. (1998). A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 17(14), 3968–80. doi:10.1093/emboj/17.14.3968

Deka, R. K., Machius, M., Norgard, M. V., & Tomchick, D. R. (2002). Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41857–64. doi:10.1074/jbc.M207402200

Don, P. C., Rubinstein, R., & Christie, S. (1995). Malignant syphilis (lues maligna) and concurrent infection with HIV. *International Journal of Dermatology*, 34(6), 403–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657439>

Duarte, G. (2004). *Diagnóstico e conduta nas infecções ginecológicas e obstétricas*. Retrieved from http://books.google.com.br/books/about/Diagnóstico_e_conduta_nas_infecções_g.html?id=8w9fAAAAAAAJ&pgis=1

Dunbar, S., & Jacobson, J. (2000). Application of the luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study. *Clinical Chemistry*, 46(9), 1498–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973900>

Dunbrack, R. L. (2002). Rotamer libraries in the 21st century. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(4), 431–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163064>

Ebel, A., Bachelart, L., & Alonso, J. M. (1998). Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 358–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Farshy, C. E., Hunter, E. F., Larsen, S. A., & Cerny, E. H. (1984). Double-conjugate enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulins G and M against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(6), 1109–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=271528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., ... Venter, J. C. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5375), 375–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665876>

Fujimura, K., Ise, N., Ueno, E., Hori, T., Fujii, N., & Okada, M. (1997). Reactivity of recombinant *Treponema pallidum* (r-Tp) antigens with anti-Tp antibodies in human syphilitic sera evaluated by ELISA. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(6), 315–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406049>

Gardella, C., Marfin, A. A., Kahn, R. H., Swint, E., & Markowitz, L. E. (2002). Persons with early syphilis identified through blood or plasma donation screening in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(4), 545–9. doi:10.1086/338829

Gray, R. R., Mulligan, C. J., Molini, B. J., Sun, E. S., Giacani, L., Godornes, C., ... Centurion-Lara, A. (2006). Molecular evolution of the tprC, D, I, K, G, and J genes in the pathogenic genus *Treponema*. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 2220–33. doi:10.1093/molbev/msl092

Hagedorn, H.-J., Kraminer-Hagedorn, A., De Bosschere, K., Hulstaert, F., Pottel, H., & Zrein, M. (2002). Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 973–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8

Hanff, P. A., Bishop, N. H., Miller, J. N., & Lovett, M. A. (1983). Humoral immune response in experimental syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 131(4), 1973–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6352809>

Hanff, P. A., Fehniger, T. E., Miller, J. N., & Lovett, M. A. (1982). Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 129(3), 1287–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7050242>

Hashimoto, K., Nishi, H., Bryant, S., & Panchenko, A. R. (2011). Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. *Physical Biology*, 8(3), 035007. doi:10.1088/1478-3975/8/3/035007

Hensel, U., Wellensiek, H. J., & Bhakdi, S. (1985). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting as a serological tool in the diagnosis of syphilitic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(1), 82–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=271580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hira, S. K., Patel, J. S., Bhat, S. G., Chilikima, K., & Mooney, N. (1987). Clinical manifestations of secondary syphilis. *International Journal of Dermatology*, 26(2), 103–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3570579>

Hirano, Y., Hossain, M. M., Takeda, K., Tokuda, H., & Miki, K. (2007). Structural studies of the Cpx pathway activator NlpE on the outer membrane of *Escherichia coli*. *Structure (London, England : 1993)*, 15(8), 963–76. doi:10.1016/j.str.2007.06.014

Hollier, L. M., & Cox, S. M. (1998). Syphilis. *Seminars in Perinatology*, 22(4), 323–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738997>

Hook, E. W., & Marra, C. M. (1992). Acquired syphilis in adults. *The New England Journal of Medicine*, 326(16), 1060–9. doi:10.1056/NEJM199204163261606

Hoover, K. W., & Radolf, J. D. (2011). Serodiagnosis of syphilis in the recombinant era: reversal of fortune. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(9), 1295–6. doi:10.1093/infdis/jir528

Horan, P. K., & Wheelless, L. L. (1977). Quantitative single cell analysis and sorting. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4313), 149–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/905822>

Jana, S., & Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 289–98. doi:10.1007/s00253-004-1814-0

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), 494–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579660>

Kim, J., Kim, W.-H., Cho, C., Kim, J., Kim, G.-Y., Nam, M.-H., ... Cho, Y. (2008). [Evaluation of automated architect syphilis TP as a diagnostic laboratory screening test for syphilis]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28(6), 475–82. doi:10.3343/kjlm.2008.28.6.475

Kim, Y. S., Lee, J., Lee, H. K., Kim, H., Kwon, H. J., Min, K. O., ... Kim, S.-Y. (2009). [Comparison of quantitative results among two automated Rapid Plasma Reagin (RPR) assays and a manual RPR test]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(4), 331–7. doi:10.3343/kjlm.2009.29.4.331

KLEYN, J., SCHWEBKE, J., & HOLMES, K. K. (1993). The validity of injecting drug users' self-reports about sexually transmitted diseases: a comparison of survey and serological data. *Addiction*, 88(5), 673–680. doi:10.1111/j.1360-0443.1993.tb02080.x

Lafond, R. E., & Lukehart, S. A. (2006). Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 29–49. doi:10.1128/CMR.19.1.29-49.2006

Larsen, S. A., Steiner, B. M., & Rudolph, A. H. (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 1–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lefevre, J. C., Bertrand, M. A., & Bauriaud, R. (1990). Evaluation of the Captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), 1704–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=268032&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lemos, E. A. de. (2007, September 13). Industrialization and evaluation of Western blotting method - WB Tp-IgG - as confirmatory for syphilis serology. Universidade de São Paulo. Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-04102007-124948/>

Lewis, D. A., & Young, H. (2006). Syphilis. *Sexually Transmitted Infections*, 82 Suppl 4, iv13–5. doi:10.1136/sti.2006.023085

Lukehart, S. A., Baker-Zander, S. A., & Holmes, K. K. (1984). Efficacy of aztreonam in treatment of experimental syphilis in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(3), 390–1. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=185528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3), 512–38. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11), 618–25. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.006

Matthews, H. M., Yang, T. K., & Jenkin, H. M. (1979). Unique lipid composition of *Treponema pallidum* (Nichols virulent strain). *Infection and Immunity*, 24(3), 713–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=414365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Miller, M. B., & Tang, Y.-W. (2009). Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 611–33. doi:10.1128/CMR.00019-09

Mullick, C. J., Liappis, A. P., Benator, D. A., Roberts, A. D., Parenti, D. M., & Simon, G. L. (2004). Syphilitic hepatitis in HIV-infected patients: a report of 7 cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(10), e100–5. doi:10.1086/425501

Nakamoto, H., & Bardwell, J. C. A. (2004). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3), 111–9. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.012

NICHOLS, H. J., & HOUGH, W. H. (1913). DEMONSTRATION OF SPIROCHAETA PALLIDA IN THE CEREBROSPINAL FLUID. *Journal of the American Medical Association*, 60(2), 108. doi:10.1001/jama.1913.04340020016005

Norris, S. J. (1993). Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. Treponema Pallidum Polypeptide Research Group. *Microbiological Reviews*, 57(3), 750–79. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Orton, S. L., Liu, H., Dodd, R. Y., & Williams, A. E. (2002). Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. *Transfusion*, 42(1), 94–99. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00023.x

Park, Y., Park, Y., Joo, S. Y., Park, M. H., & Kim, H.-S. (2011). Evaluation of a fully automated treponemal test and comparison with conventional VDRL and FTA-ABS tests. *American Journal of Clinical Pathology*, 136(5), 705–10. doi:10.1309/AJCP0WOK0QDYGDCM

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084

Pietravalle, M., Pimpinelli, F., Maini, A., Capoluongo, E., Felici, C., D'Auria, L., ... Ameglio, F. (1999). Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection. *The New Microbiologica*, 22(2), 99–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322608>

Pogliano, J., Lynch, A. S., Belin, D., Lin, E. C., & Beckwith, J. (1997). Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes & Development*, 11(9), 1169–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159398>

Purcell, B. K., Chamberlain, N. R., Goldberg, M. S., Andrews, L. P., Robinson, E. J., Norgard, M. V., & Radolf, J. D. (1989). Molecular cloning and characterization of the 15-kilodalton major immunogen of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 57(12), 3708–14. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=259894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Radolf, J. D., & Lukehart, S. A. (2006). Pathogenic *Treponema*: molecular and cellular biology. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20063160918.html;jsessionid=96A75121260DC602366F6A70A2B08D49>

Ratnam, S. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Médicale / AMMI Canada*, 16(1), 45–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2095002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Remaut, H., & Waksman, G. (2006). Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(8), 436–44. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.007

Rotta, O. (2005). Diagnóstico sorológico da sífilis* Serological diagnosis of syphilis. Retrieved September 27, 2014, from <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n3/v80n3a14.pdf>

Ruiz, N., & Silhavy, T. J. (2005). Sensing external stress: watchdogs of the Escherichia coli cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 122–6. doi:10.1016/j.mib.2005.02.013

Sáez-Alquézar, A., Albieri, D., Castanho Garrini, R. H., Marques, W. P., De Lemos, E. A., & Alves, A. (2008). DESEMPENHO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA SÍFILIS, TREPONÊMICOS (ELISA) E NÃO TREPONÊMICOS (VDRL E RPR), NA TRIAGEM SOROLÓGICA PARA DOADORES DE SANGUE – CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS POR MEIO DE TRÊS TESTES TREPONÊMICOS (FTA ABS, WB E TPHA). *Revista de Patologia Tropical*, 36(3). doi:10.5216/rpt.v36i3.3173

Salazar J, A., Perret P, C., Chavez P, A., Garcia C, P., Millan O, Z., Goycoolea M, M., ... Quiroga G, T. (2000). Evaluación de métodos diagnósticos para sífilis congénita. *Revista Chilena de Infectología*, 17(4), 289–296. doi:10.4067/S0716-10182000000400002

Sali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779–815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626

Sambri, V., Marangoni, A., Eyer, C., Reichhuber, C., Soutschek, E., Negosanti, M., ... Cevenini, R. (2001). Western immunoblotting with five Treponema pallidum recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3), 534–9. doi:10.1128/CDLI.8.3.534-539.2001

Sánchez, P. J., McCracken, G. H., Wendel, G. D., Olsen, K., Threlkeld, N., & Norgard, M. V. (1989). Molecular analysis of the fetal IgM response to Treponema pallidum antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(3), 508–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644381>

Sánchez, P. J., Wendel, G. D., & Norgard, M. V. (1992). IgM antibody to Treponema pallidum in cerebrospinal fluid of infants with congenital syphilis. *American Journal of Diseases of Children (1960)*, 146(10), 1171–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415044>

Sato, N. S., Hirata, M. H., Hirata, R. D. C., Zerbini, L. C. M. S., Silveira, E. P. R., De Melo, C. S., & Ueda, M. (1999). Analysis of Treponema pallidum recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 41(2), 115–118.

Sato, N. S., Hirata, M. H., Hirata, R. D., Zerbini, L. C., Silveira, E. P., de Melo, C. S., & Ueda, M. (1999). Analysis of Treponema pallidum recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41(2), 115–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413959>

Sato, N. S., Suzuki, T., Ueda, T., Watanabe, K., Hirata, R. D. C., & Hirata, M. H. (2004). Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.], 37(7), 949–55. doi:S0100-879X2004000700002

Sato, N. S., & Takeda, A. K. (1996). Antígeno recombinante 47kDa de *Treponema pallidum*: caracterização imunológica e estudo comparativo com o antígeno nativo. *Rev. Bras. Anal. Clin*, 28(1), 8–11. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=535141&indexSearch=ID>

Schmidt, P. J. (2001). Syphilis, a disease of direct transfusion. *Transfusion*, 41(8), 1069–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493741>

Schmunis, G. A., Zicker, F., Cruz, J. R., & Cuchi, P. (2001). Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994-1997. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(6), 924–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792000>

Seña, A. C., White, B. L., & Sparling, P. F. (2010). Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(6), 700–8. doi:10.1086/655832

Sharp, P. M., & Li, W. H. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1281–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=340524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Sheffield, J. S., & Wendel, G. D. (1999). Syphilis in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 42(1), 97–106; quiz 174–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073304>

Silva, M. I. M. M. da. (2009). Identificação e genotipagem de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* em amostras clínicas. Retrieved from <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1808>

Singh, a E., & Romanowski, B. (1999). Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 187–209. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Smajs, D., McKevitt, M., Howell, J. K., Norris, S. J., Cai, W.-W., Palzkill, T., & Weinstock, G. M. (2005). Transcriptome of *Treponema pallidum*: gene expression profile during experimental rabbit infection. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1866–74. doi:10.1128/JB.187.5.1866-1874.2005

Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W244–8. doi:10.1093/nar/gki408

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–28. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.004

Spiro, A., Lowe, M., & Brown, D. (2000). A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4258–65. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Sun, A., Fan, X., Shen, X., Tang, R., & Yan, J. (2009). [Recombinant expression of the fusion antigen based on *Treponema pallidum* TpN17 and TpN47 epitope peptides and establishment and application of the associated ELISA]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 25(8), 1187–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19938456>

Sun, A. H., Mao, Y. F., Hu, Y., Sun, Q., & Yan, J. (2009). Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC*, 47(3), 321–6. doi:10.1515/CCLM.2009.071

Svergun, D., Barberato, C., & Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28(6), 768–773. doi:10.1107/S0021889895007047

Temmerman, M., Gichangi, P., Fonck, K., Apers, L., Claeys, P., Van Renterghem, L., ... Bwayo, J. (2000). Effect of a syphilis control programme on pregnancy outcome in Nairobi, Kenya. *Sexually Transmitted Infections*, 76(2), 117–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1758283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tsang, R. S. W., Martin, I. E., Lau, A., & Sawatzky, P. (2007). Serological diagnosis of syphilis: comparison of the Trep-Chek IgG enzyme immunoassay with other screening and confirmatory tests. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1), 118–24. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00289.x

Van der Sluis, J. J., Onvlee, P. C., Kothe, F. C., Vuzevski, V. D., Aelbers, G. M., & Menke, H. E. (1984). Transfusion syphilis, survival of *Treponema pallidum* in donor blood. I. Report of an orientating study. *Vox Sanguinis*, 47(3), 197–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6380106>

Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T., & Ikemura, T. (1992). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Research*, 20 Suppl, 2111–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Walker, D. G., & Walker, G. J. A. (2002). Forgotten but not gone: the continuing scourge of congenital syphilis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2(7), 432–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127355>

Walker, E. M., Borenstein, L. A., Blanco, D. R., Miller, J. N., & Lovett, M. A. (1991). Analysis of outer membrane ultrastructure of pathogenic *Treponema* and *Borrelia* species by freeze-fracture electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5585–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=208278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Walker, G. J. (2001). Antibiotics for syphilis diagnosed during pregnancy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD001143. doi:10.1002/14651858.CD001143

Weigel, L. M., Brandt, M. E., & Norgard, M. V. (1992). Analysis of the N-terminal region of the 47-kilodalton integral membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 60(4), 1568–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257032&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

WHO. (2001). WHO | Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Retrieved from http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/HIV_AIDS_2001_2/en/

WHO, W. H. (2008). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. Retrieved September 25, 2014, from file:///C:/Users/Master/Aulas BIOCEL/Documents/Global Incidence 2008.pdf

Wicher, K., Horowitz, H. W., & Wicher, V. (1999). Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 1(12), 1035–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617935>

Yelton, D. B., Limberger, R. J., Curci, K., Malinosky-Rummell, F., Slivienski, L., Schouls, L. M., ... Charon, N. W. (1991). *Treponema phagedenis* encodes and expresses homologs of the *Treponema pallidum* TmpA and TmpB proteins. *Infection and Immunity*, 59(10), 3685–93. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Young, H., Moyes, A., Seagar, L., & McMillan, A. (1998). Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 913–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zoechling, N., Schluepen, E. M., Soyer, H. P., Kerl, H., & Volkenandt, M. (1997). Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *The British Journal of Dermatology*, 136(5), 683–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205499>